Experimentelle Studien

über

die Fermente des Honigs

mit besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung für die praktische Nahrungsmittelkontrolle

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät Sektion III der Universität Leipzig

vorgelegt am 5. Mai 1914

von

Friedrich Gothe

aus Gandersheim

Verlagsbuchhandlung von Julius Springer in Berlin

1914

Druck: Königl. Universitätsdruckerei H. Stürtz A. G., Würzburg.

Experimentelle Studien

über

die Fermente des Honigs

mit besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung für die praktische Nahrungsmittelkontrolle

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät Sektion III der Universität Leipzig

vorgelegt am 5. Mai 1914

von

Friedrich Gothe
aus Gandersheim

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

Verlagsbuchhandlung von Julius Springer in Berlin
1914
Druck: Königl. Universitätsdruckerei H. Stürtz A. G., Würzburg.

Angenommen von der III. Sektion auf Grund der Gutachten der Herren Paal und Hantzsch.

Leipzig, den 5. Mai 1914.

Der Prokanzellar:
Kirchner.

Parallelpublikation: Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahr.- u. Genußmittel Bd. 28, H. 6, S 273—321.

Meiner lieben Mutter!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547001_0032

Nachstehende zwei Abhandlungen wurden während der Zeit Sept. 1911 bis Februar 1913 im Staatlichen Hygienischen Institut zu Hamburg bearbeitet. In vorliegender Fassung März 1913 im Manuskript fertiggestellt, kommen die Arbeiten aus äußeren Gründen erst jetzt zur Veröffentlichung.

Herrn Dr. O. Kammann, der mir in liebenswürdiger Weise mit seinem Rat zur Seite stand, möchte ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Inhaltsübersicht.

Seite

Experimentelle Studien über die Fermente des Honigs, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung für die praktische Nahrungsmittelkontrolle . 1

I. Die Fermente des Honigs 7

I. Kohlenhydratspaltende Enzyme 9

1. Inulase 9

2. Lactase 11

3. Invertase 11

II. Katalase 14

III. Proteasen 16

1. Peptische Enzyme 16

2. Tryptische Enzyme 18

IV. Lipasen 19

V. Zusammenfassung 20

II. Experimentelle Studien über Eigenschaften und Wirkungsweise der Honigdiastase sowie die Beurteilung des Honigs auf Grund seines Diastasegehaltes 20

I. Die quantitative Bestimmung der Diastase im Honig 20

II. Die Wirkungsweise der Honigdiastase 27

Das Verhalten gegenüber:

1. Kochsalz 27

2. Säuren und Alkalien 29

3. Alkoholfällung 33

4. Filtration 34

5. Dialyse 36

6. Schüttelbewegung 38

7. Erhitzen 39

III. Herkunft der Honigdiastase 43

IV. Untersuchung von 75 Honigproben auf ihren Diastasegehalt 44

1. Ausländische Honige 44

2. Einheimische Honige 48

3. Zuckerfütterungshonige und Kunstprodukte 49

4. Honige unbekannter Herkunft 50

V. Zusammenfassung 52

1. Beurteilung des Honigs auf Grund des Diastasegehaltes 52

2. Schlußsätze 54

I. Die Fermente des Honigs.

Mit den Fermenten im Bienenkörper beschäftigten sich im Jahre 1873 Fischer und v. Siebold[1]) und ein Jahr darauf Erlenmeyer und v. Planta[2]). Letztere wiesen ein invertierendes und diastasierendes Enzym sowohl im wässerigen Auszug der Arbeitsbienen als auch im Honig und den Pollenkörnern nach.

Die Honigfermentforschung ruhte dann bis zum Jahre 1902. In seinem Vortrag auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte bemerkt Langer[3]) einleitend, daß das Gutachten des Kaiserlichen Gesundheitsamtes vom Jahre 1900 wenig Aussicht bietet, mittels rein chemischer Verfahren Kunsthonig von echtem Bienenhonig zu unterscheiden. Seiner Ansicht nach verspricht das Studium der Physiologie des Honigs mehr Aussicht auf Erfolg. Die Anwesenheit eines invertierenden und diastatischen Fermentes ist als charakteristisches Merkmal des Bienenhonigs anzusehen. Er isolierte die Fermente mittels Alkoholfällung und suchte später[4]) durch Messung der fermentativen Kraft dieser Niederschläge Anhaltspunkte für die Beurteilung echter Bienenhonige, ihrer Fälschungen sowie von Kunsthonigen zu gewinnen.

Axenfeld (1903)[5]) fand nach Entfernung des Zuckers durch Dialyse eine kräftig wirkende Invertase im Honig. Er forschte nach der Quelle dieses Fermentes, wobei sich herausstellte, daß der Darm nicht nur der Bienen, sondern auch anderer Insekten, der Wespe, der Dipteren, ebenso der Muscaria canaria kräftig Saccharose invertierte.

In demselben Jahre erschien eine Abhandlung von Marpmann[6]) „Beiträge zur Prüfung und Beurteilung des Bienenhonigs". Nach diesem Autor sind drei verschiedene Enzyme im „frischen" Honig vorhanden, alkoholbildende, invertierende und eiweißspaltende. Für den Nachweis der Fermente wendet Marpmann die katalytischen Methoden an. Eine Lösung von Paraphenylendiamin wird mit der wässerigen Honigprobe gemischt, hierauf tropfenweise Wasserstoffsuperoxyd zugefügt. Der reine Schleuderhonig färbt sich dann blaugrau, violett bis indigoblau. Der gekochte Honig

---

[1]) Pharm. Jahresbericht 1873.
[2]) Maly's Jahresbericht 1879, S. 264, 266.
[3]) Diese Zeitschrift 1902, **5**, 1204.
[4]) Vgl. Langer, Archiv f. Hygiene 1909, **71**, 312.
[5]) Zentralbl. f. Physiologie 1903, **17**, 268–271.
[6]) Pharm. Ztg. 1903, **48**, 1010.

färbt sich nicht. Auch mit Guajaktinktur tritt Blaufärbung ein. Diese Reaktion haben mehrere Autoren nachgeprüft.

1908 brachte Utz[1]) einen Artikel „Über die Marpmann'sche Reaktion zur Unterscheidung von Schleuderhonig und von Honig, der durch Erhitzen gewonnen wurde". Er hat diese Reaktion mit einigem Erfolg angewandt und kommt zu dem Ergebnis, daß viele einheimische Honigsorten, die unter der Bezeichnung „Schleuderhonig" geliefert werden, diese Bezeichnung nicht verdienen. Andererseits beweisen seine Untersuchungen, daß es Kunsthonig gibt, desgleichen Gemische von erhitztem und nicht erhitztem Honig, welche die Reaktion wie nicht erhitzter Bienenhonig (Schleuderhonig) zeigen.

1909 hat v. Raumer[2]) mittels der Marpmann'schen Reaktion die Frage zu entscheiden versucht, ob erhitzte oder verfälschte Honige als solche zu erkennen seien. Er kommt jedoch zu keinem brauchbaren Ergebnis, wie er überhaupt mit dieser Reaktion sehr schlechte Erfahrungen gemacht hat.

Ein Jahr darauf lieferte Auzinger[3]) auf Grund eingehender Untersuchungen den Beweis, daß die sog. Peroxydasereaktion (Marpmann'sche Reaktion) eine rein chemische Reaktion ist, die durch Fructose hervorgerufen wird (Parareaktion I), und daß die sog. Reduktasereaktion durch stark reduzierende, zum Teil flüchtige organische Säuren bedingt wird (Parareaktion II). Ferner wandte sich Auzinger insbesondere dem Studium der Enzyme zu, deren Vorhandensein ohne vorausgehende Isolierung und Fällung nachzuweisen war. Mit dem Nachweis von Katalase und Diastase im Honig lenkte er die Untersuchung und Beurteilung des Honigs in neue Bahnen. Nach Voermann[4]) können die Enzymreaktionen Auzinger's vielleicht gute Dienste leisten, doch hält er seine Erfahrungen darüber für zu gering, um ein Urteil abgeben zu können. In einem in Gemeinschaft mit Bakker[5]) veröffentlichten Artikel (1911) ist die Diastaseprobe nach Auzinger bei einer Anzahl Honigproben angewendet worden. Sie geben die Farbtöne an, welche die Reaktionsgemische (Ferment und Substrat) nach erfolgter Digestion beim Hinzufügen der Jodlösung aufweisen.

1910 veröffentlichte Lenz[6]) einen Aufsatz: „Über ein neues peptisches Enzym im Honig".

1911 erprobte Witte[7]) die praktische Verwendbarkeit der von Auzinger in die Honigchemie eingeführten Methoden. Seine auf breiter Basis aufgebauten Untersuchungen führten ihn zu dem Ergebnis, daß die Diastaseprobe der Katalasereaktion vorzuziehen sei. Ersterer, als der wichtigsten Reaktion nach Auzinger, wird eine hervorragende Bedeutung für die Honigbeurteilung beizumessen sein.

Über Invertase und Diastase im Honig berichtet v. Fellenberg[8]). Das Honigdextrin wird zum großen Teil durch die Speicheldiastase der Bienen (Honigdiastase) hydrolysiert. Nach seinen Untersuchungen geht die Inversion der Saccharose durch

[1]) Zeitschr. öffentl. Chem. 1908, **14**, 21—28.

[2]) Diese Zeitschrift 1909, **17**, 122.

[3]) Diese Zeitschrift 1910, **19**, 65, 353.

[4]) Zeitschr. öffentl. Chem. 1910, **16**, 401.

[5]) Daselbst 1911, **17**, 461—467.

[6]) Apoth.-Ztg. 1910, No. 72; diese Zeitschrift 1912, **23**, 108.

[7]) Diese Zeitschrift 1911, **21**, 305; Zeitschr. öffentl. Chem. 1912, **18**, 390. Zit. Schlegel, Jahresbericht Nürnberg 1910 und Baier, Jahresbericht Brandenburg 1911.

[8]) Mitteil. a. d. Gebiete d. Nahrungsmitteluntersuchung und Hygiene, Schweizer. Gesundheitsamt 1911, **2**, 369—377.

das spezifische Ferment, die Invertase, in wasserarmen Honigen nicht so schnell vor sich wie in wasserreichen. Die Hauptrolle bei diesem Prozeß spielt das spezifische Ferment, die Invertase, während die Säure höchstens die Reaktion fördernd beeinflußt. Bei Honiguntersuchungen ist es von Wichtigkeit, daß die Lösungen zur Ermittelung des Zuckergehaltes sofort verarbeitet werden, anderenfalls findet eine Inversion der etwa vorhandenen Saccharose statt. In 30 Proben echten Honigs in 1%-iger Lösung nahm der Invertzuckergehalt von 0,27 bis 6,64% zu. Moreau[1]) bestätigt die Ergebnisse Auzinger's und bestimmt in einer größeren Anzahl Honigproben verschiedener Herkunft die Fermente quantitativ, nach ihrer Isolierung durch Alkoholfällung.

Thöny[2]) 1912 hat gelegentlich seiner Veröffentlichung über „die Verwendung der quantitativen Präcipitinreaktion bei Honiguntersuchungen" Versuche über die Fermente des Honigs angestellt. Betreffs der Katalase schließt er sich dem Urteil Witte's an: Die Katalasezahl für sich allein läßt höchstens in den extremsten Fällen nach oben und unten einen Schluß zu auf starke Verunreinigung bezw. beginnende Gärung und auf stärkeres Erhitzen. Die Diastaseprobe hält er für wertvoll, da sie schnell darüber Auskunft gibt, ob ein Honig erhitzt ist oder nicht. In Verbindung mit anderen Analysendaten kann sie Honigfälschungen bestätigen.

Schlegel und Baier haben gute Erfahrungen mit der Diastasereaktion gemacht.

Achert[3]) zeigt an praktischen Beispielen, daß Rohrzucker vom Bienenhonig bei Zimmer- und selbst bei Wintertemperatur allmählich invertiert wird, vorausgesetzt daß der Honig nicht zu hoch erhitzt war. Ein Verschnitt von Honig und 42,17% Saccharose, der eine Stunde bei 50° erwärmt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde, wies nach Ablauf eines Jahres nur 3,11% Saccharose auf. Er findet in Übereinstimmung mit v. Fellenberg, daß die Säure nur eine untergeordnete Rolle bei der Inversion spielt, denn die neutralisierten Honig-Saccharosegemische wurden eher kräftiger invertiert. Auf Grund experimenteller Untersuchungen kommen Fiehe und Stegmüller[4]) zu dem Ergebnis, daß der Nachweis einer Erhitzung des Honigs auf Temperaturen über 85° durch die Diastasereaktion mit Sicherheit geführt werden kann. Muttelet[5]) hat bei seinen Studien über türkische Honige die Reaktion nach Auzinger angewandt. Sie verlief in sämtlichen Fällen positiv, d. h. es trat eine rapide Verzuckerung der Stärke ein; die stickstoffreichsten Honige besaßen die kräftigste Diastasereaktion.

I. Kohlenhydratspaltende Enzyme.

1. Inulase.

Wie die Versuche von Loeb und Higuchi und anderer Autoren[6]) lehren, ist das Inulin ein schwer spaltbares Kohlenhydrat, welches nach Abderhalden[7]) weder

[1]) Annales des Falsifications 1911, No. 28 u. 29.

[2]) Mitteil. a. d. Gebiete d. Nahrungsmitteluntersuchung und Hygiene Schweiz. Gesundheitsamt 1912, **3**, 92.

[3]) Diese Zeitschrift 1912, **23**, 136.

[4]) Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1912, **40**, 304.

[5]) Diese Zeitschrift 1912, **24**, 353.

[6]) Biochem. Zeitschrift 1909, **22**, 316.

[7]) Abderhalden, Biochemisches Handlexikon, **2**, 187.

durch Invertin und Amylase noch durch Ptyalin und Emulsin angegriffen wird. Die Spaltung desselben setzt die Anwesenheit des spezifischen Fermentes, der Inulase, voraus.

Die Kohlenhydrate der Inulingruppe sind in der Natur sehr verbreitet; so sind einige Phanerogamenfamilien sehr reich an Inulin (Compositen, Campanulaceen, Violaceen u. a.). Es kommt hier vor als charakteristischer Reservestoff sowohl in den unterirdischen Organen als auch in den Blütenköpfchen (Abderhalden). Nach diesem reichlichen Vorkommen des Inulins wäre man wohl berechtigt, auf eine stark wirkende Bienen- und damit Honiginulase zu schließen, da in der Natur dann spezifische Enzyme entstehen, wenn sie zur Ausübung ihrer Funktion benötigt werden. Die Bildung des Enzyms wird erst durch Anwesenheit von bestimmten Nährstoffen angeregt[1]).

Hinsichtlich der Wirkungsweise ist zu bemerken, daß nach Abderhalden die Inulase bei ganz schwach saurer Reaktion ($^1/_{1000}$ N.) am günstigsten wirkt. Die Versuchsanordnung war folgende: 10 g eines Honigs, dessen geringer Saccharosegehalt durch 48-stündiges Erwärmen bei 38—40° völlig invertiert war, wurden in destilliertem Wasser gelöst, so lange mit $^1/_{20}$ N.-Natriumcarbonatlösung versetzt, bis die Lösung eine schwach saure Reaktion gegen Lackmus zeigte, dann auf 100 ccm aufgefüllt. 10 ccm hiervon wurden auf 0,10 g in warmem Wasser (10 ccm) gelöstes Inulin einwirken gelassen. Nach beendeter Digestion wurde die Lösung in einen 100 ccm-Kolben übergeführt, enteiweißt (2 ccm Bleiessig + 8 ccm Natriumphosphat) und bis zur Marke aufgefüllt. In 25 ccm des Filtrates wurde das Reduktionsvermögen mittels Fehling'scher Lösung festgestellt. Das durch Allihn'sche Röhren abfiltrierte Kupferoxydul wurde im Luftstrom geglüht und als Kupferoxyd zur Wägung gebracht. Die in der Tabelle zusammengestellten Zahlen stellen die experimentell gefundenen Werte ohne Umrechnung dar.

Versuch No.	Art der Lösung	g Kupferoxyd, gefunden			
		nach 6 Stunden	nach 12 Stunden	nach 24 Stunden	nach 48 Stunden (Durchschnitt v. 8 Bestimmung.)
I.	1. 10 ccm Honiglösung (10 g : 100 ccm) nach der Digerierung verdünnt zu 100 ccm, davon 25 ccm	0,4096	0,4122	0,4116	0,4115
	2. Inulin 0,10 g in 10 ccm Wasser gelöst	0,4085	0,4140	0,4138	
II	1. 10 ccm Honiglösung (10 g : 100 ccm) nach der Digerierung verdünnt zu 100 ccm, davon 25 ccm	0,4024	0,4020	0,4054	0,4062
	2. 10 ccm Wasser (Kontrolle) .	0,4047	0,4038	0,4037	
III.	1. Inulin 0,10 g in 10 ccm Wasser gelöst, nach der Digerierung verdünnt zu 100 ccm, davon 25 ccm	0	0,0007	0	0,0002
	2. (Kontrolle)	0,0002	0	0	—

[1]) Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme, S. 4.

Trotz der größten Bemühungen und der vielfach in veränderter Anordnung ausgeführten Versuche war es mir unmöglich, zu günstigeren Ergebnissen zu gelangen infolge der durch die Schwerspaltbarkeit des Inulins bedingten geringen Zunahme an Kupferoxyd. Bemerken möchte ich noch, daß die Versuche mit den durch Alkohol isolierten Enzymen durchweg unbefriedigend verliefen.

Wenn auch die Erwartung, ein stark wirksames inulinspaltendes Enzym im Honig vorzufinden, damit nicht bestätigt wird, so läßt doch die geringe Erhöhung des Reduktionsvermögens gegenüber den Kontrollversuchen mit Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit einer Inulase im Honig schließen.

2. Lactase.

Die Lactase ist das spezifische Milchzucker hydrolysierende Ferment. Letzterer wird unter dem Einfluß des Enzyms in d-Glykose und d-Galaktose gespalten. Das Optimum der Lactasewirkung liegt nach Fuhrmann[1]) bei 39°. Milchzucker kommt im Pflanzenreich selten vor. Trotzdem könnte von vornherein auf die Anwesenheit eines Milchzucker spaltenden Fermentes im Honig geschlossen werden, weil der Organismus der Biene durch den Besitz stark saccharifizierender Fermente im hohen Grade befähigt ist, Kohlenhydrate abzubauen.

Sowohl das Disaccharid, die Lactose, wie seine Spaltungsprodukte, reduzieren Fehling'sche Lösung. Der Nachweis der hydrolytischen Spaltung muß auf dem Wege der Polarisationsänderung geführt werden.

Sowohl die durch Alkohol isolierten Enzyme, als auch die direkt hergestellte Lösung (10 g: 100 ccm) wurden bei 38—40° verschieden lange Zeit auf 1, 3 und 5 %-ige Milchzuckerlösungen einwirken gelassen. Die Polarisationswerte erlitten jedoch, nach dem Aufhören der Multirotation, keine Änderung.

Durch alle einschlägigen Versuche konnte mit Sicherheit das Fehlen einer Lactase im Honig festgestellt werden.

3. Invertase.

a) Herkunft: Langer[2]) suchte die Frage zu entscheiden, ob die Invertase des Honigs pflanzlicher oder tierischer Abstammung sei. Auf Grund seiner Untersuchungen kommt er zu dem Ergebnis, daß die Honiginvertase tierischer Herkunft ist.

Zu gerade entgegengesetztem Ergebnisse gelangte Küstenmacher[3]). Nach ihm ist sie nicht arteigenes Sekret der Biene, sondern sie wird von den Pflanzen im Spermatoplasma des Pollens gebildet.

Zwecks Klarstellung dieser Frage ließ ich Pollenextrakt und den Extrakt aus Bienen, die während des Winters für unsere Zwecke abgetötet, also frei von Pollen waren, getrennt auf Saccharoselösung im Brutschrank einwirken.

[1]) Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme S. 4.
[2]) Archiv f. Hygiene 1909, 71, 312.
[3]) Biochem. Zeitschrift 1911, 30, 249.

Ferment	Saccharose-lösung (5 %)	Polarisation im 200 mm-Rohr		
		bei Beginn des Versuchs	nach 24 Stunden	nach 48 Stunden
10 ccm Pollenextrakt (Crocus) . . .	100 ccm	+ 6,20°	+ 2,33°	+ 1,55°
10 „ „ (Ambrosia) . .	100 ccm	+ 6,20°	+ 1,05°	+ 0,75°
10 „ „ (Ambrosia) gekocht, (Kontrolle)	100 ccm	+ 6,20°	+ 6,20°	+ 6,20°
10 ccm Wasser (Kontrolle)	100 ccm	+ 6,20°	+ 6,20°	+ 6,20°
Bienenextrakt I 10 ccm	100 ccm	+ 6,25°	+ 1,00°	— 0,18°
„ II 10 ccm	100 ccm	+ 6,25°	+ 0,25°	— 0,88°
„ I gekocht (Kontrolle) .	100 ccm	+ 6,25°	+ 6,25°	+ 6,25°
„ II gekocht (Kontrolle) .	100 ccm	+ 6,25°	+ 6,25°	+ 6,25°

Zwecks steriler Durchführung des Versuches wurde 1 ccm Toluol hinzugefügt. Die Tabelle läßt erkennen, daß sowohl der Bienenorganismus wie die Pollenkörner invertierende Enzyme enthalten, daß demnach animalische wie pflanzliche Invertase sich im Honig befinden werden. Daß die Biene selbst eine arteigene Invertase besitzen muß, geht schon daraus hervor, daß sie während der Zuckerfütterung eine große Menge Rohrzucker invertiert. In einem Zuckerfütterungshonig wird die Invertase animalischer Herkunft 100% betragen, in einem Naturhonig teilweise durch pflanzliche Invertase ersetzt sein.

Nunmehr suchte ich der Frage näherzutreten, wie sich Zuckerfütterungshonige hinsichtlich des Invertasegehaltes gegenüber echten Honigen verhalten.

Wie schon erwähnt, treten Enzyme besonders dort auf, wo sie zur Ausübung ihrer Funktion erforderlich sind. Bei Fütterung der Bienen ausschließlich mit Saccharose werden diese gleichsam trainiert, invertierende Enzyme in hohem Maße zu bilden. Demnach könnten von vornherein erhebliche Mengen dieses Fermentes im Fütterungshonig vermutet werden. Andererseits wäre es möglich, daß diese Produkte nur eine verhältnismäßig geringe invertierende Kraft besitzen, da ihnen ein Bestandteil, nämlich die Phyto- (Pollen-) Invertase, fehlt.

Zur Entscheidung der Frage wurden die Fermente durch Alkoholfällung isoliert. 10 g jedes Honigs wurden in wenig Wasser gelöst und mit der 5-fachen Menge absoluten Alkohols versetzt. Nach dem Absitzen wurden die Niederschläge quantitativ abfiltriert und die mit Alkohol nachgewaschenen Filter in 100 ccm einer 5%-igen Saccharoselösung gebracht; die invertierende Kraft der einzelnen Niederschläge wurde durch die hervorgerufene Polarisationsänderung gemessen.

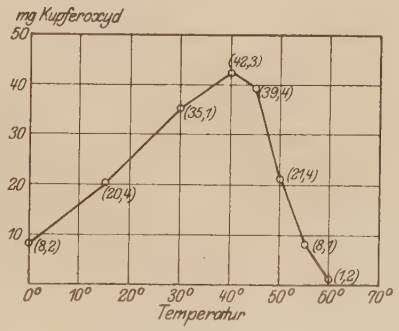
Als Kontrollen dienten die Saccharoselösung ohne Ferment und eine ebensolche Lösung, in die während des Siedens das Filter mit dem Fermentniederschlag hineingebracht war. Als Antisepticum wurde jedem Glas 1 ccm Toluol zugesetzt.

Die Versuche lassen erkennen, daß die invertierende Kraft der Zuckerfütterungshonige bei weitem schwächer war als die der echten Honige.

No.	Fermentniederschlag aus	Saccharose-lösung	Polarisation im 200 mm-Rohr		
			Beginn des Versuches	nach 24 Stunden	nach 2 Tagen
31	Heidehonig	100 ccm	+ 6,60°	+ 1,37°	— 0,05°
34	Heide- und Buchweizenhonig .	100 ccm	+ 6,60°	+ 2,20°	+ 0,55°
41	Zuckerfütterungshonig . . .	100 ccm	+ 6,60°	+ 3,85°	+ 2,10°
42	„	100 ccm	+ 6,60°	+ 5,95°	+ 5,28°
	—	100 ccm (Kontrolle)	+ 6,60°	+ 6,60°	+ 6,60°
31	Heidehonig (Kontrolle) . . .	+ 100 ccm (gekocht)	+ 6,60°	+ 6,60°	+ 6,60°

b) Das Optimum der Honiginvertase: Nach Fuhrmann ist die Invertase ein sehr empfindliches Enzym; durch kurz dauernde Erhitzung auf 70° wird es zerstört. Der Höhepunkt der Wirkung von Hefeinvertase liegt bei 50°. Dies läßt sich jedoch nicht auf Invertasen anderer Herkunft übertragen, da die Temperaturoptima verschieden sind. Interessant ist, daß sogar bei Invertase unter- und obergäriger Hefen Unterschiede in der günstigsten Temperatur für ihre Wirkung festgestellt wurden. Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der einzelnen Temperaturen auf die Wirksamkeit der Honiginvertase liegen meines Wissens nicht vor.

Versuchsanordnung: 30 g Honig wurden in wenig Wasser gelöst und mit der 5-fachen Menge absoluten Alkohols versetzt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren von der alkoholischen Flüssigkeit getrennt, mit Wasser fein zerrieben und im 150 ccm-Kolben bis zur Marke aufgefüllt. Je 5 ccm der Lösung wurden mit 5 ccm 5 %-iger Saccharoselösung versetzt und bei den nachstehend angegebenen Temperaturen im Wasserbade digeriert. Nach Ablauf von genau 1 Stunde wurde das Reaktionsgemisch quantitativ in einen 50 ccm-Kolben übergeführt, enteiweißt, aufgefüllt und filtriert. In je 25 ccm des Filtrates wurde das Reduktionsvermögen mittels Fehling'scher Lösung bestimmt; die Zahlen stellen die Durchschnittswerte (mg CuO) der einzelnen Doppelbestimmungen dar. Durch den blinden Versuch (Aufkochen) wurde der Invertzuckergehalt der Lösung festgestellt und die gefundene Kupferoxydmenge von den ermittelten Durchschnittswerten in Abzug gebracht.



Temperatur	0°	15°	30°	40°	45°	50°	55°	60°	70°
Kupferoxyd, mg	8,2	20,4	35,1	42,3	39,4	21,4	8,1	1,2	0

Vorstehende Kurve gibt die Wirksamkeit der isolierten Honiginvertase bei den einzelnen Erhitzungsgraden graphisch wieder. Schon bei 0° war ein geringer

Effekt zu verzeichnen, der bei zunehmender Temperatur anstieg und bereits bei 40° sein Optimum erreichte. Über 45° trat starke Hemmung ein; bei 60° war das Ferment bis auf ein Minimum seiner Wirkung beraubt.

II. Katalase.

Im Jahre 1901 wies Loew[1]) ein Enzym nach, welches die spezifische Eigenschaft besaß, Wasserstoffsuperoxyd in molekularen Wasserstoff und Sauerstoff zu spalten, und legte ihm den Namen „Katalase" bei. Auzinger[2]) wies als erster dieses Ferment im Honig nach. Von seinen eingehenden Studien über die Honigkatalase hebe ich folgende Punkte hervor:

a) Normale Honige entbinden, bei Anwendung von Auzinger's Versuchsanstellung, 10—50 mm Sauerstoff.

b) Die Abwesenheit von Honigkatalase ist verdächtig. In solchem Falle kann es sich um höher erhitzten, anormalen (unreifen, Blattlaus- oder Zuckerfütterungs-) Honig handeln.

c) Bei gärenden Honigen tritt durch Mitwirkung der Bakterien- und Hefekatalase eine wesentliche Erhöhung der Sauerstoffabspaltung ein; Kunsthonige sind im allgemeinen frei von Katalase.

d) Nach einstündigem Erhitzen bei 70° trat zwar eine Hemmung der Katalasewirkung ein, doch war der entwickelte Sauerstoff immerhin noch meßbar.

Witte[3]) bestätigte im großen und ganzen Auzinger's Angaben. Er ist der Ansicht, daß von einem Schleuderhonig als Minimum eine Katalasezahl von 10 mm zu verlangen ist.

Nach Voermann[4]) wird die Menge des entwickelten Sauerstoffs durch die Gewinnung und Aufbewahrung der Honige beeinflußt.

Von Moreaus[5]) Untersuchungsergebnissen ist hervorzuheben, daß die katalasereichsten Honige die kräftigste diastatische Wirkung auslösen. Thöny[6]) stellte fest, daß auch Zuckerfütterungshonige sehr hohe Katalasezahlen aufweisen können, desgleichen amerikanische Honige. Er führt dies darauf zurück, daß letztere Proben stark verunreinigt waren, wie der mikroskopische Befund bestätigte. Sehr wichtig ist seine Beobachtung, daß die reinen Schleuderhonige aus Deutschland und der Schweiz verhältnismäßig kleine Zahlen ergaben.

Über meine einschlägigen Untersuchungen gibt nachstehende Tabelle Auskunft. Die Methodik war die gleiche wie bei Auzinger und Witte. Ich arbeitete ebenfalls mit dem Gärungssaccharometer nach Einhorn.

---

[1]) Nach Koning, Milchwirtsch. Zentralbl. 1907, 3, 58.

[2]) Diese Zeitschrift 1910, **19**, 65, 353.

[3]) Diese Zeitschrift 1911, **21**, 305; Zeitschr. öffentl. Chem. 1912, **18**, 390.

[4]) Zeitschr. öffentl. Chem. 1910, **16**, 401.

[5]) Annales des Falsifications 1911, No. 28 u. 29.

[6]) Mitteil. a. d. Gebiete d. Nahrungsmittelunters. u. Hygiene. Schweizer. Gesundheitsamt 1912, **3**, 92.

Lfd. No.	Bezeichnung der Versuchshonige	Diastasezahl [1])	Gasmenge in mm					
			nach 24 Stunden		nach 48 Stunden		nach 72 Stunden	
			unfiltriert	filtriert	unfiltriert	filtriert	unfiltriert	filtriert
31	Scheibenhonig (selbst ausgelassen)	38,5	3,0	2,0	4,0	2,0	4,0	3,0
32	Scheibenhonig (selbst ausgelassen)	38,5	1,0	1,0	1,0	1,0		
33	Heidehonig	23,8	12,0	1,0	17,0	6,0		
34	Spätherbsthonig (Heide- u. Buchweiz.)	23,8	12,0	12,0	24,0	24,0	34,0	33,0
35	Scheibenhonig (selbst ausgelassen)	29,4	5,0	4,0	7,0	7,0		
36	Gärender Spätherbsthonig	17,9	34,0	8,0	42,0	12,0	52,0	15,0
39	Sommerhonig 1911	13,9	Spuren	Spuren	2,0	2,0		
40	Sommerhonig 1912	17,9	Spuren	Spuren	1,0	1,0		
41	Gärender Fütterungshonig	8,3	52,0	22,0	56,0	23,0		
42	Fütterungshonig rein	10,9	2,0	2,0	3,0	3,0		
9	Blattlaushonig	29,4	14,0	10,0	18,0	12,0	26,0	19,0
14	Havannahonig, verunreinigt	23,8	55,0	34,0	56,0	41,0		
44	Kunsthonig	0	0	0	1,0	1,0		

Hieraus geht hervor:

1. daß die Fermente Diastase und Katalase dem Mengenverhältnis nach ungleich in den Honigen verteilt sind, insofern einem hohen Diastasegehalt eine niedrige Katalasezahl sehr oft entspricht;
2. daß durch die Filtration der Honiglösung (1 + 2) eine ganz erhebliche Schwächung der Katalase unter Umständen hervorgerufen wird (vergl. Diastase);
3. daß echte Scheibenhonige sehr niedrige Katalasezahlen aufweisen können.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen Voermann's und Thöny's, stehen aber teilweise in gewissem Widerspruch mit den Befunden von Moreau, Witte und Auzinger (a, b). Eine Erklärung ist meines Erachtens in der Verschiedenartigkeit des Materials zu erblicken, über dessen Gewinnungsweise in den meisten Fällen eine sichere Feststellung nicht möglich ist. Eine große Bedeutung ist der Katalasezahl insofern zuzuerkennen, als ein sehr hoher Befund einen Honig als stark verunreinigt zu erkennen gestattet.

Die Erhitzungsversuche ergaben, daß durch einstündiges Erhitzen bei 60° die Katalase nur dann erheblich in ihrer Wirkung gehemmt wird, wenn eine wässerige Lösung des Honigs zur Verwendung gelangt. Bei 70° tritt jedoch eine Schwächung

[1]) Vgl. S. 22.

der Katalase auch im unverdünnten Honig ein. Diese Versuche wurden in Reagensgläschen vorgenommen, das Verdunsten des Wassers wurde durch gutschließende Gummikappen verhindert.

Ferment	Auf 60° erhitzt				Auf 70° erhitzt	
	entwickelte Gasmenge in mm				entwickelte Gasmenge in mm	
	nach 24 Stunden		nach 48 Stunden		nach 24 Stunden	nach 48 Stunden
	unfiltriert	filtriert	unfiltriert	filtriert	unfiltriert	unfiltriert
I. Honig unverdünnt erhitzt .	30,0	4,0	38,0	8,0	12,0	24,0
II. Honiglösung (1+2) erhitzt .	16.0	4.0	26,0	8,0	6,0	14,0
III. Honiglösung (1+2) unerhitzt (Kontrolle)	34,0	8,0	42,0	12,0	34,0	42,0

III. Proteasen.

Die Spaltung der nativen Eiweißstoffe erfolgt allgemein entweder durch peptische (bei saurer Reaktion wirkende) oder durch tryptische (bei alkalischer Reaktion wirkende) Enzyme.

Während der Abbau der Proteine durch erstere Gruppe nur bis zum Pepton vor sich geht, ist die Spaltung durch tryptische Enzyme viel weitgehender und energischer, nämlich bis zu den Aminosäuren Leucin, Tyrosin und anderen.

1. Peptische Enzyme.

Mit dem Studium proteolytischer Fermente im Honig beschäftigte sich im Jahre 1903 Marpmann[1]). Nach seiner Annahme sind diese Fermente im Honig enthalten; Belege sind jedoch nicht angeführt.

1910 teilte Lenz[2]) in einem Aufsatz „Über ein neues peptisches Enzym im Honig" folgenden Vorgang mit: Ein Apotheker stellte sich Meth her durch Impfen einer Honiglösung mit Weinhefe. Durch Luftzutritt trat Essigsäuregärung ein, und es entstand ein Essig von gutem Geschmack, der bei der Zurichtung von Rollmöpsen verwendet wurde. Als diese nun eines Tages verzehrt werden sollten, fanden sich nur Holzstückchen, Gurken- und Zwiebelscheiben in der Schüssel vor, während die Rollmöpse verschwunden waren. Zwecks Aufklärung dieses Vorganges wurde dieser 4 %-ige Essig untersucht, und Lenz stellte die Anwesenheit eines stark peptischen Enzyms fest. Wenn es mir schon gewagt erscheint, von dem eingelieferten Essig allgemein auf peptische Enzyme im Honig zu schließen, so besagt auch der Nachweis an und für sich nicht viel, da dem Autor ein prinzipieller Versuchsfehler unterlaufen ist. Ist es doch bekannt, daß die Hefearten stark peptolytische Wirkungen auszulösen vermögen[3]).

[1]) Pharm. Ztg. 1903, **48**, 1010.
[2]) Apoth.-Ztg. 1910, **25**, 678; diese Zeitschrift 1912, **23**, 108.
[3]) König, Chemie der menschl. Nahrungs- u. Genußmittel 2, 1168 (1904).

Da der Nachweis peptischer Enzyme durch meine einschlägigen, nachstehend beschriebenen Untersuchungen nicht bestätigt wurde, so ist die Annahme wohl berechtigt, daß durch Impfen mit Weinhefe peptische Enzyme in die Honiglösung hineingelangt sind.

Zur Prüfung des Honigs auf peptische Enzyme bediente ich mich wissenschaftlich anerkannter Methoden, die sämtlich den Vorzug besitzen, schon nach Ablauf kurzer Zeit eindeutige Ergebnisse zu liefern. Wenn auch das Hinzufügen eines Antisepticums zur Verhinderung bakterieller Einflüsse nicht notwendig erscheint, so ist es doch ratsam, die Versuche steril anzuordnen und durchzuführen.

a) Die Ricinprobe ist nach Michaelis[1]) „eine wirkliche Bereicherung der Methodik". Sie beruht darauf, daß Ricin, ein in den Ricinussamen vorkommender Eiweißkörper, bei saurer Reaktion in feinen Flocken ausgefällt wird, die durch die Wirkung des peptischen Enzyms aufgelöst werden. Zur Herstellung der Eiweißlösung werden 2 g Ricin (nach Jakoby) mit 50 ccm 3 %-iger Chlornatriumlösung versetzt, einige Minuten kräftig durchgeschüttelt; die Emulsion wird eine Stunde im Wasserbade bei 40° digeriert, dann filtriert. Dem klaren Filtrat wird auf je einen Volumteil $^1/_2$ bis $^1/_3$ Volumteil $^1/_{10}$ N.-Salzsäure zugesetzt. Die Lösung wird getrübt, nach kurzer Zeit werden feine Flocken gebildet. Der Zusatz von Säure geschieht allmählich; ein zu großer Überschuß muß vermieden werden, da dieser die Auflösung des Niederschlages nach sich ziehen würde. Die Anordnung des Versuches geht aus der Tabelle hervor. Zu erwähnen ist noch, daß vorzugsweise Honige mit hohem Eiweißgehalt zur Prüfung herangezogen wurden, die also in erster Linie Aussicht auf Erzielung eines positiven Ergebnisses boten. Von diesen wurde eine konzentrierte Lösung (1 + 2) hergestellt, die durch einige Tropfen Sodalösung auf schwach saure Reaktion gebracht war.

Glas	Fermentlösung	Ricinaufschwemmung	Wasser, steril	Verhalten der Lösung nach 0 Minuten	15 Minuten	30 Minuten	45 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
1	2 ccm Honiglösung (1+2)	5 ccm	—	—	—	—	—	—	—	—
2	1 ccm Pepsinlösung 1 : 100	5 „	1 ccm	—	opalesz.	+	+	+	+	+
3	Desgl. 1 : 500	5 „	1 „	—	—	+	+	+	+	+
4	Desgl. 1 : 1000	5 „	1 „	—	—	opalesz.	+	+	+	+
5	Desgl. 1 : 5000	5 „	1 „	—	—	—	—	—	opalesz.	+
6	Desgl. 1 : 10000	5 „	1 „	—	—	—	—	—	—	—
7	—	5 „ (Kontr. I)	2 „	—	—	—	—	—	—	—
8	2 ccm Honiglösung (1+2) (Kontrolle)	(Kontr. II) —	5 „	klar	klar	klar	klar	klar	klar	klar

Erklärung der Zeichen: + = abgebaut (klar).
— = nicht abgebaut (Trübung).

[1]) Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 3 (Abschnitt Fermente).

Nach zweistündiger Digerierung bei 37° baute eine sehr verdünnte Pepsinlösung 1 : 5000 5 ccm der eingangs beschriebenen Ricinaufschwemmung ab, während die konzentrierte Honiglösung keine Wirkung entfaltet hatte.

b) Edestinmethode. Das Edestin ist im Gegensatz zum Ricin ein Eiweißkörper, der bei saurer Reaktion löslich, bei neutraler oder alkalischer Reaktion unlöslich ist. Durch Zusatz von Alkalilauge oder durch Kochsalz in Substanz wird nicht abgebautes Edestin ausgefällt. Ist alles Eiweiß verdaut, so bleibt die Lösung auf Hinzufügen von Kochsalz klar.

Die Versuchsanstellung war ähnlich wie bei der eben beschriebenen Ricinprobe, mit dem Unterschied, daß in kurzen Zwischenräumen Pröbchen (0,5 ccm) entnommen und mit Kochsalz versetzt wurden.

Nach $1^1/_2$ Stunden hatte eine stark verdünnte Pepsinlösung (1 : 1000) 5 ccm der angewandten Edestinlösung völlig verdaut. Der Versuch mit Honigfermentlösung war dagegen eindeutig negativ verlaufen.

c) Endlich möchte ich die Fibrinflockenmethode erwähnen. Fibrin, ein Eiweißkörper des Rinderblutes, wird bei Gegenwart peptolytischer Enzyme aufgelöst.

In Übereinstimmung mit den früheren Befunden wurde auch mittels dieses Verfahrens das Fehlen peptischer Fermente im Honig bestätigt.

2. Tryptische Enzyme.

Lenz konnte im Anschluß an seine Untersuchungen über die peptische Wirksamkeit des aus Honig hergestellten Meth-Essigs feststellen, daß letzterer nach dem Neutralisieren keine proteolytische Kraft mehr aufwies. Er schließt hieraus, daß der Honig wohl peptische, aber keine tryptischen Enzyme enthielt.

Meine in dieser Richtung angestellten Versuche bestätigten dieses negative Ergebnis. Ich arbeitete mit der sehr empfindlichen, von Groß, Fuld und Michaelis ausgearbeiteten Caseinmethode[1]). 0,1 g Casein wird in wenig Wasser und etwa 8 Tropfen einer 10%-igen Natriumcarbonat-Lösung unter Erwärmen gelöst und mit sterilem Wasser zu 200 ccm aufgefüllt. 5 ccm hiervon werden mit 2 ccm der durch $^1/_{20}$ N.-Natriumcarbonatlösung auf schwache Alkalescenz gebrachten Honiglösung (1 + 2) gemischt und im Wasserbade bei 37—40° digeriert. Von Zeit zu Zeit werden dem Reaktionsgemisch Pröbchen (0,5 ccm) entnommen und mit einigen Tropfen stark verdünnter Essigsäure (0,25%) geprüft, ob eine Trübung entsteht. Ist alles Casein durch das Ferment abgebaut, so bleibt die Probe nach Zusatz der Essigsäure klar. Die Menge der zuzusetzenden Essigsäure die eine optimale Ausfällung des nicht verdauten Caseins bewirkt, wird durch den blinden Versuch festgestellt. Im vorliegenden besonderen Falle wurde durch 5 Tropfen 0,25%-iger Essigsäure eine starke Trübung der entnommenen Probe (0,5 ccm) hervorgerufen. Bei zu geringem Zusatz von Säure tritt keine Trübung ein, bei zu großem Überschuß wird der anfangs gebildete Niederschlag gelöst.

Hervorzuheben ist noch, daß die Honiglösung klar oder höchstens schwach opalisierend sein muß.

---

[1]) Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 3 (Abschnitt Fermente).

Glas No.	Fermentlösung	Caseinlösung 1 : 2000 ccm	Wasser, steril ccm	Verhalten der Caseinlösung nach 0 Minuten	15	30	45	60	75	90
1	2 ccm Honiglösung (1 + 2) .	5	—	—	—	—	—	—	—	—
2	1 ccm Trypsinlösung 1 : 100 .	5	1	—	+	+	+	+	+	+
3	Desgl. 1 : 500	5	1	—	+	+	+	+	+	+
4	„ 1 : 1000	5	1	—	opalisierend	+	+	+	+	+
5	„ 1 : 5000	5	1	—	—	opalisierend	+	+	+	+
6	„ 1 : 10000	5	1	—	—	—	—	opalisierend	opalisierend	+
7	—	5 (Kontr.)	2	—	—	—	—	—	—	—
8	2 ccm Honiglösung 1 + 2 (Kontrolle)	—	5	klar	klar	klar	klar	klar	klar	klar

Diese Versuche, die stets eindeutig verliefen, lassen erkennen, daß während $1^1/_2$ Stunden, in denen 5 ccm der Caseinlösung (1 : 2000) von der sehr verdünnten Trypsinlösung (1 : 10000) verdaut waren, keine tryptische Wirkung des Honigfermentes wahrzunehmen war.

Auf Grund dieser Versuche komme ich zu dem Schluß, daß ein Ferment von der Art des Trypsins im Honig nicht vorhanden ist.

IV. Lipasen.

Der Nachweis der fettspaltenden Enzyme oder der Lipasen gründet sich auf ihre Eigenschaft, Fette in Glycerin und freie Fettsäure zu spalten. Letztere wird durch titrierte Alkalilauge gemessen.

Sowohl die durch Alkohol isolierten Enzyme als auch die Honigfermentlösung direkt wurden verschieden lange Zeit auf Neutralfett, auf Monobutyrin und auf Olivenöl einwirken gelassen und nach der Digestion mit $^1/_{10}$ N.-Natronlauge titriert. Niemals konnte eine deutliche Zunahme an Säure gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Der schärfste Nachweis einer stattgehabten Fett- bezw. Esterspaltung kann auf physikalisch-chemischem Wege mittels des Traube'schen Stalagmometers geführt werden. Die Methode, welche von Michaelis und Rona[1]) ausgearbeitet wurde, beruht auf der Tatsache, daß eine gesättigte Mono- oder Tributyrinlösung eine große Oberflächenspannung gegenüber den Spaltprodukten besitzt. Infolge des fermentativen (lipolytischen) Prozesses wird das Neutralfett gespalten, und dieser Spaltung entsprechend wird die Tropfenzahl verringert. Selbst nach längerer (3-stündiger) Einwirkung der Honiglösung auf die gesättigte, wässerige Monobutyrinlösung war die Tropfenzahl unverändert dieselbe geblieben.

Aus diesen Versuchen schließe ich, daß lipolytische Enzyme im Honig nicht vorhanden sind.

[1]) Biochem. Zeitschrift 1911, **33**, 463.

V. Zusammenfassung.

1. Laktase, Proteasen (peptische und tryptische Enzyme) und Lipasen sind im Honig nicht nachzuweisen.

2. Die Anwesenheit von Inulase ist mit Wahrscheinlichkeit anzunehmen.

3. Invertase:

a) Die Honiginvertase ist sowohl tierischer wie pflanzlicher Herkunft. Sie ist im echten Bienenhonig in größerer Menge vorhanden als im Fütterungshonig.

b) Das Wirkungs-Optimum der isolierten Honiginvertase liegt bei 40°, durch einstündiges Erhitzen auf 60° wird das Ferment nahezu zerstört.

4. Katalase:

a) Die Katalase und Diastase sind nicht proportional im Honig vorhanden: einem hohen Diastasegehalt entspricht oft eine niedrige Katalasezahl.

b) Durch Filtrieren der Honigfermentlösung kann eine erhebliche Hemmung der katalytischen Wirkung herbeigeführt werden.

c) Der Wert der Katalasebestimmung ist darin zu erblicken, daß eine starke Verunreinigung des Honigs durch eine sehr hohe Katalasezahl gekennzeichnet wird. Eine niedrige Katalasezahl ist weder beweisend für eine stattgehabte Erhitzung noch für einen minderwertigen Honig.

d) Die Honigkatalase erfährt eine deutliche Schädigung ihrer Wirkung
bei 60° durch einstündiges Erhitzen der Honiglösung,
erst „ 70° „ „ „ des unverdünnten Honigs.

II. Experimentelle Studien über Eigenschaften und Wirkungsweise der Honigdiastase sowie die Beurteilung des Honigs auf Grund seines Diastasegehaltes.

I. Die quantitative Bestimmung der Diastase im Honig.

Den Nachweis bezw. die quantitative Bestimmung des diastatischen Fermentes im Honig haben Auzinger[1]) (1910) und Moreau[2]) (1911) in die Honigchemie eingeführt. Die beiden Methoden können ganz allgemein als typisch für die Bestimmung fast aller Fermente gelten. Da letztere als solche nicht charakterisiert werden können, sondern nur durch ihre Wirkungsweise erkannt werden, so beobachtet man einmal

[1]) Diese Zeitschrift 1910, 19, 65 und 353.
[2]) Annales des Falsifications 1911, No. 28 u. 29.

das Verschwinden des Substrates, z. B. der Stärke (a), oder man ermittelt die Menge der Spaltungsprodukte (b).

a) Die qualitative Prüfung auf Diastase nach Auzinger.

10 ccm der Honiglösung (1+2) werden mit 1 ccm 1%-iger Stärkelösung während einer Stunde bei 45° digeriert. Ist in der Lösung Diastase, ein Hauptbestandteil des Bienenspeichels, vorhanden, so wird die Stärke während dieser Zeit in Zucker oder dessen Vorstufen, in Dextrine, verwandelt. Man überzeugt sich davon, indem man zu dem Reaktionsgemisch 1 ccm einer Jod-Jodkaliumlösung (1 : 2 : 300) gibt, umschüttelt und den Farbton feststellt. Ist alle Stärke umgewandelt, so ist die Farbe nur um ein geringes dunkler als die ursprüngliche Honiglösung. Ist keine Stärke umgesetzt worden, so ist die Farbe tiefschwarzblau. Bei den meisten echten Schleuderhonigen ist der Farbton bei den angegebenen Mengenverhältnissen der Reagenzien hellolivgrün bis hellbräunlich. Hellrötliche bis rotbraune Färbung deutet auf Dextrine (besonders Erythrodextrin) hin. Gekochte Honiglösungen sind tiefblau bis tiefschwarzblau, weil sie keine wirksame Diastase mehr enthalten.

Fiehe und Stegmüller[1]) führen die Reaktion in etwas abgeänderter Form aus. 5 ccm einer 20%-igen Honiglösung (anstatt 10 ccm einer Lösung (1+2)) werden nach Zugabe von 1 ccm einer 1%-igen Stärkelösung bei 40° (anstatt 45°) erwärmt.

b) Quantitative Bestimmung der Honigdiastase nach Moreau[2]).

Moreau isoliert die Fermente, indem er 10 g Honig in wenig Wasser löst und die Eiweißkörper durch 100 ccm Alkohol fällt. Den abzentrifugierten Niederschlag nimmt er in Wasser auf, filtriert und läßt die klare Lösung, welche neutralisiert und mit 1,5 ccm 1%-iger Ameisensäure versetzt ist, auf Stärke während 24 Stunden bei 45—50° einwirken. Er bestimmt dann die Menge der Diastase durch das Reduktionsvermögen des gebildeten Zuckers gegenüber Fehling'scher Lösung.

Der Gehalt an reduzierbaren Substanzen, ausgedrückt als Glykose, schwankt zwischen 0,60—3,68% (12 Honige).

Dieses Verfahren, das Ferment quantitativ zu bestimmen aus dem Reduktionsvermögen der unter dem Einfluß des Enzyms entstandenen Spaltungsprodukte, hat zweifellos den Vorteil, zahlenmäßig unter sich vergleichbare Werte zu liefern. Wegen seiner Umständlichkeit jedoch ist es für die Praxis kaum geeignet, außerdem haften ihm verschiedene Fehlerquellen an, wie später gezeigt werden soll.

Der quantitativen Bestimmung der Diastase im Honig legte ich das Prinzip der Jodstärkereaktion zugrunde, die Wohlgemuth[3]) ausgearbeitet und für seine medizinischen Untersuchungen angewandt hat.

10 g Honig werden in destilliertem Wasser gelöst, mit 1/20 N.-Natriumcarbonatlösung neutralisiert und in einem 100 ccm-Kolben bis zur Marke aufgefüllt. Nach

[1]) Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1912, **40**, 305.
[2]) Annales des Falsifications 1911, No. 28 u. 29.
[3]) Biochem. Zeitschrift 1908, **10**, 1.

Überführung der Lösung in einen Erlenmeyer-Kolben wird eine Reihe weiter Reagensgläser mit nachstehend bezeichneten Mengen dieser Fermentlösung beschickt und jedem Gläschen hinzugefügt:

0,5 ccm einer frisch bereiteten $^1/_{50}$ N.-Essigsäurelösung[1]),
0,5 ccm $^1/_{10}$ N.-Kochsalzlösung,
und nachstehend angegebene Mengen 1%-iger Stärkelösung.

Alle Gläschen werden mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 16 ccm gebracht. Nach vorsichtigem Hin- und Herschwenken zwecks Erzielung einer homogenen Reaktionsflüssigkeit werden alle Gläser gleichzeitig in ein Wasserbad von 45—50° C gebracht, genau eine Stunde darin belassen und nach Ablauf dieser Zeit in Eiswasser gestellt. Nach dem Abkühlen wird in jedes Glas, von I. beginnend, ein Tropfen einer $^1/_{10}$ N.-Jodlösung hinzugegeben und mit dem Inhalt des Glases gemischt. Die unter dem Einfluß des Fermentes gebildeten Abbauprodukte der Stärke geben dem Gläscheninhalt die Farbtöne gelb, oliv, braun, hellrot, dunkelrot, (Glykose und Achroodextrin mit Jod farblos, Erythrodextrin rot, Amylodextrin purpurn gefärbt). Das Gläschen, in welchem zuerst ein unverkennbar blauer Farbton auftritt, in welchem also noch Stärke unverändert enthalten ist, wird als unterste Grenze der Wirksamkeit mit limes bezeichnet. Aus der Fermentmenge des vorhergehenden Gläschens, welche imstande war, alle Stärke bis auf Dextrin abzubauen, wird berechnet, wieviel ccm Stärkelösung durch 1 g Honig hydrolysiert werden. Die so ermittelte Zahl, die ich im folgenden der Kürze halber mit Diastasezahl (D. Z.) benenne, gibt die ccm 1%-iger Stärkelösung an, welche durch 1 g Honig während einstündiger Einwirkung unter optimalen Verhältnissen abgebaut werden.

Schema für die Ausführung der Diastasezahl im Honig.

Glas	Enzymlösung	Wasser ccm	Essigsäure ($^1/_{50}$ N.) ccm	Kochsalzlösung ($^1/_{10}$ N.) ccm	Stärkelösung ccm	Gesamt-Volumen ccm	D. Z. (berechnet)
I	10 ccm (= 1 g)	4	0,5	0,5	1	16	1
II	10 „ (= 1 „)	2,5	0,5	0,5	2,5	16	2,5
III	10 „ (= 1 „)	0	0,5	0,5	5	16	5
IV	7,7 „ (= 0,77 „)	2,3	0,5	0,5	5	16	6,5
V	6,0 „ (= 0,60 „)	4,0	0,5	0,5	5	16	8,3
VI	4,6 „ (= 0,46 „)	5,4	0,5	0,5	5	16	10,9
VII	3,6 „ (= 0,36 „)	6,4	0,5	0,5	5	16	13,9
VIII	2,8 „ (= 0,28 „)	7,2	0,5	0,5	5	16	17,9
IX	2,1 „ (= 0,21 „)	7,9	0,5	0,5	5	16	23,8
X	1.7 „ (= 0,17 „)	8,3	0,5	0,5	5	16	29,4
XI	1,3 „ (= 0,13 „)	8,7	0,5	0,5	5	16	38,5
XII	1,0 „ (= 0,10 „)	9,0	0,5	0,5	5	16	50,0

Zur Erklärung führe ich drei typische Beispiele für die Ermittelung der Diastasezahl an:

[1]) $^1/_{50}$ N.-Essigsäure ist nicht lange haltbar; man stellt sich zweckmäßig einen Vorrat von $^1/_{10}$ N.-Essigsäure her und verdünnt diese.

Fermentlösung ccm	Wasser	Essigsäure (1/50 N.) ccm	Kochsalzlösung (1/10 N.) ccm	Stärkelösung 1 %-ige ccm	Farbton beim Hinzufügen eines Tropfens 1/10 N.-Jodlösung	D. Z.
			Heidehonig 31:			
2,8	7,2	0,5	0,5	5	+ helloliv	—
2,1	7,9	0,5	0,5	5	+ dunkeloliv	—
1,7	8,3	0,5	0,5	5	+ hellrot	—
1,3	8,7	0,5	0,5	5	+ dunkelrot	38,5
1,0	9,0	0,5	0,5	5	blau violett:limes	—
Berechnung: 0,13 g Honig baute 5 ccm Stärkelösung ab; daher gilt: 0,13 : 5 = 1,0 : x; x = DZ = 38,5.						
			Honig 66:			
6,0	4,0	0,5	0,5	5	+ helloliv	—
4,6	5,4	0,5	0,5	5	+ dunkeloliv	—
3,6	6,4	0,5	0,5	5	+ rotviolett	13,9
2,8	7,2	0,5	0,5	5	blau : limes	—
2,1	7,9	0,5	0,5	5	— blau	—
			Kunsthonig 43:			
10	4,0	0,5	0,5	1	— blau : limes	0
10	2,5	0,5	0,5	2,5	— blau	—
10	0	0,5	0,5	5	— blau	—
7,7	2,3	0,5	0,5	5	— blau	—

Zeichenerklärung: + Stärke ist abgebaut; — Stärke nicht abgebaut.

Bemerkungen zur Methode.

Empfindlichkeit der Methode: Das Verfahren ist nicht quantitativ im chemischen Sinne, gibt aber ein für die Praxis hinreichend genaues Bild von der im Honig enthaltenen Menge Diastase.

Nach den ersten Versuchen, die ich nur kurz andeuten will, bei denen Honiglösungen (1+2), 20 %- und 5 %-ige Lösungen verwendet wurden, erwies sich die Konzentration (10 g : 100 ccm) als praktisch geeignet. Zur Erzielung einer möglichst großen Genauigkeit wandte ich Fermentmengen an, die nahe beieinander lagen z. B. 10,0, 9,5, 9,0, 8,5 ccm usw. Es stellte sich jedoch heraus, daß diese Abstufungen zu gering waren, sodaß die Umschläge, nach Hinzufügen der Jodlösung nicht scharf eintraten. Zudem gelangt man bei einer solchen Einteilung der Fermentmengen zu ungleichwertigen „geometrischen Zwischenräumen". Soll die Differenz zwischen den einzelnen Gliedern der Reihe dieselbe Bedeutung haben, so ist die Einteilung der absteigenden Fermentmengen auf Grund von geometrischen Reihen vorzunehmen[1]). Nach zahlreich ausgeführten Versuchen gelangte ich zu der oben angegebenen Einteilung der Fermentmengen, die, abgesehen von Glas I und II, nach diesem Gesichtspunkt geordnet sind. Wenn auch hiernach der Endpunkt der Reaktion nach einiger Übung exakt zu erkennen ist, so kann man doch zuweilen im Zweifel sein, ob der Farbton als unverkennbar „blau" anzusprechen oder die nächst geringere Fermentmenge als limes zu bezeichnen ist. In einem solchen zweifelhaften Fall setzt man dem Gläscheninhalt einen zweiten Tropfen der 1/10 N.-Jodlösung zu. Ist der End-

[1]) Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, 3, Abschnitt: Fermente.

punkt bereits erreicht, so schlägt die violette Farbe in Tiefblau um, im entgegengesetzten Fall erscheint ein brauner Farbton. Die Feststellung des Farbtones geschieht bei einem Gesamtvolumen von 16 ccm.

Zur Ausführung der Diastasebestimmung bedient man sich zweckmäßig weiter Reagensgläser (180×20 mm); alle Abmessungen erfolgen bei 15° C mittels graduierter Pipetten, in deren oberem verjüngtem Teil ein Wattebausch nach Art steriler Pipetten eingeführt ist, um ein Einfließen von Speichel auszuschalten.

Als Fermentflüssigkeit dient stets, wenn nicht ausdrücklich anderes gesagt ist, die Auflösung von 10 g Honig, welche mit $^1/_{20}$ N.-Sodalösung neutralisiert und mit Wasser von 15° C im 100 ccm-Kolben bis zur Marke aufgefüllt ist.

Die Bestimmung ist möglichst bald nach Herstellung der Fermentlösung auszuführen, da letztere sehr leicht bakterieller Zersetzung unterworfen ist, wodurch die amylolytische Kraft reduziert bezw. aufgehoben wird. Für alle Honigfermentuntersuchungen ist zweckmäßig destilliertes Wasser zu benutzen, welches längere Zeit gekocht und wieder gekühlt ist. Der Gehalt an Fermenten bildet das Charakteristikum für den Bienenhonig, und somit kann die Diastasemenge gewissermaßen als Wertmesser der Honige in biologischer Hinsicht dienen, und zwar bedeutet eine sehr hohe Diastasezahl einen biologisch wertvollen, eine sehr niedrige Diastasezahl einen minderwertigen Honig.

Wie die später näher erörterten Untersuchungen lehren, weisen gehaltvolle Honige mit kräftigem Aroma ausnahmslos hohe Diastasezahlen auf (Heidehonige, Domingohonige, Honigtauhonige). Mit dem Zurücktreten dieser Eigenschaften geht im allgemeinen eine Abnahme des Diastasegehaltes parallel.

Diese Beobachtung tritt beispielsweise bei den Hawaihonigen (vergl. IV, 1, b) recht deutlich in Erscheinung. Die beiden Algaroba-Blütenhonige 6 und 7 mit ihrem schwachen Aroma ergaben die Zahlen 6,5 und 8,3. Honig 8, in welchem schon Honigtau geschmacklich zu erkennen war, wies einen mittleren Diastasegehalt auf, während die reinen Honigtauhonige (9, 10, 11) mit dem eigenartigen, recht kräftigen Aroma hohe Werte lieferten.

Demgemäß hat der Bestimmung der Diastasezahl die Geschmacksprobe voraufzugehen. Liegt ein Kunstprodukt vor oder ein Honig von fadem Geschmack, ist also eine niedrige Diastasezahl zu erwarten, so ist es nicht erforderlich, den ganzen Versuch anzusetzen. Die Durchführung mit Glas I bis VI führt hier schon zum Ziel. Bei einem geschmacklich als Honig von mittlerer Qualität diagnostizierten Honig käme Glas VI—IX, bei Spätherbst- (Buchweizen-, Heide-)Honigen sowie gehaltvollen Auslandhonigen (Domingohonigen) Glas IX - XII in Frage. Dementsprechend bezeichne ich im folgenden ganz allgemein Diastasezahlen unter 10 als niedrige, von 10—20 als mittlere, über 20 als hohe Diastasezahlen. Sind 10 ccm einer Honiglösung (10 g : 100 ccm) nicht imstande, 0,01 g Stärke bei optimalen Verhältnissen zu hydrolysieren, so ist der Honig aus Zweckmäßigkeitsgründen amylolytisch als unwirksam (D. Z. = 0) zu betrachten. Ergibt die geschmackliche Prüfung keine sicheren Anhaltspunkte für die Qualität des Honigs, so ist die Ausführung der Diastasebestimmung in möglichst vielen Gläsern, unter Umständen im ganzen Umfange vorzunehmen.

Herstellung der Stärkelösung: 3 g Stärke (Amylum solubile Merck) werden in einer Porzellanschale unter Benutzung eines Glasstabes mit kaltem Wasser angerührt, quantitativ in einen Erlenmeyer-Kolben mit heißem Wasser gespült

und die Lösung eine halbe Stunde im Sieden erhalten. Nach Überführen derselben in einen 300 ccm-Kolben wird auf 15° C abgekühlt, mit destilliertem Wasser zur Marke aufgefüllt und durch ein großes, gut laufendes Faltenfilter filtriert.

Die vollkommen quantitative Herstellung der 1%-igen Stärkelösung ist für vorliegende Zwecke durchaus unerläßlich. Sie muß klar, höchstens schwach opaleszierend, auf alle Fälle frei von Stärkepartikelchen sein, da in solchem Falle niemals einwandfreie Resultate erzielt werden könnten.

Hinsichtlich der Stärkelösung bemerkt Auzinger, daß diese im Sommer leicht zur Fäulnis neigt, und empfiehlt daher, sie frisch herzustellen oder öfter aufzukochen. Für quantitative Bestimmungen würde selbstverständlich letztere Manipulation gar nicht in Frage kommen. Dagegen schien es mir vom Standpunkt der Praxis aus wichtig, Untersuchungen darüber anzustellen, wie lange Zeit diese Substratlösung für quantitative Zwecke brauchbar ist.

Diese wie alle weiteren Versuche sind in möglichst abgekürzter Form wiedergegeben.

Fermentlösung	Stärkelösung 5 ccm				
	Erster Tag (klar bis schwach opalisierend)		Zweiter Tag (klar bis schwach opalisierend)	Dritter Tag (getrübt)	Vierter Tag (getrübt)
ccm	unfiltriert	filtriert	unfiltriert	filtriert	filtriert
2,8	+	+	+	+	+
2,1	limes	limes	limes	+	+
1,7	—	—	—	+	+
1,3	—	—	—	limes	+
1,0	—	—	—	—	+
0,8	—	—	—	—	limes
D. Z.	17,9	17,9	17,9	29,4	50

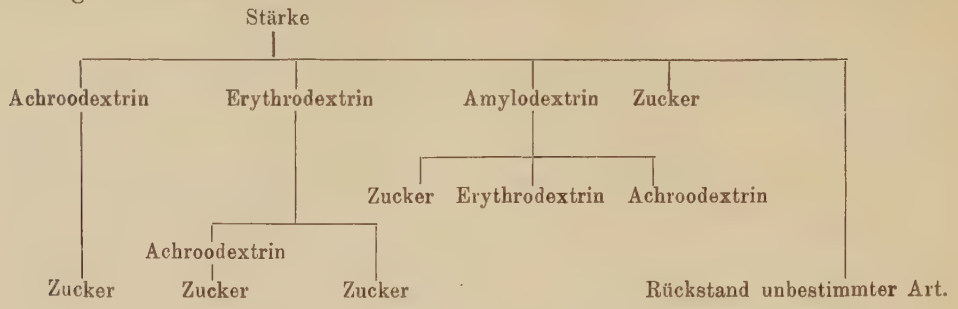
Aus der Tabelle geht hervor, daß schon am dritten Tage nach der Herstellung der Lösung ein erheblicher Teil der gelösten kolloiden Stärke unter Molekularvergrößerung ausgefallen war und infolge des hierdurch bedingten Filtrierens zurückgehalten wurde (Erhöhung der Diastasezahl). Eine weitere beträchtliche Abnahme des Titers wurde am vierten Tage konstatiert (D. Z. = 50).

Unter der Voraussetzung, daß die Stärkelösung nur in klarem oder schwach opaleszierendem Zustande verwendet wird, würde diese nur zwei Tage für quantitative Diastasebestimmungen geeignet sein. Da es etwas umständlich erscheint, so oft die Stärkelösung zu erneuern, so wäre zu empfehlen, gleich eine Reihe von Honigproben auf ihren Diastasegehalt zu untersuchen.

Über den Abbau der Stärke herrschen verschiedene Ansichten. Ich möchte die Ergebnisse der preisgekrönten Arbeit von Moreau[1]) kurz erwähnen, welcher die Frage der Stärkehydrolysierung neu behandelt hat, indem er mittels fraktionierter Barytfällung die Abbauprodukte reinigte und zu zuckerfreien Dextrinen gelangte. Nach diesem Autor wird gleich nach der ersten Minute Zucker und außerdem Amylo-

[1]) Oppenheimer, Die Fermente. Spezieller Teil S. 83.

dextrin, und dann nacheinander Erythrodextrin, Achroodextrin und Zucker gebildet nach folgender Skizze.



Auffüllen der Reaktionsgemische auf ein bestimmtes Volumen: Betreffs der Versuchsanstellung habe ich geprüft, ob die Diastasezahl beeinflußt wird, wenn die Reaktionsgemische in den einzelnen Gläschen auf ein bestimmtes Volumen gebracht werden. — Die Herstellung des gleichen Gesamtvolumens bei der Verfolgung der Fermentwirkung im allgemeinen bezeichnet Michaelis[1]) als „höchstwichtiges Postulat“. Es mag dahingestellt bleiben, ob die Durchführung dieses biologischen Gesetzes vom praktischen Gesichtspunkt aus erforderlich ist, wenn das Volumen der Fermentlösung nur geringen Schwankungen unterworfen ist. Bei der Bestimmung der Honigdiastase jedoch, wo die Fermentmengen in weiten Grenzen schwanken und auch die Mengen der Stärkelösung nicht stets die gleichen sind, wäre es vom biologischen Standpunkt nicht zu rechtfertigen, wenn obengenannter Forderung nicht entsprochen würde. Dazu kommt, daß der Farbton bei ein und demselben Volumen festzustellen ist. Allerdings zeigte der Versuch, daß infolge der stattgehabten Verdünnung eine, wenn auch geringe, Abnahme der amylolytischen Wirkung eintrat, welche nicht aufgehoben wurde, wenn das zum Auffüllen angewandte Wasser durch eine 8%-ige Invertzuckerlösung ersetzt wurde. Erst durch eine geeignete Zugabe von Kochsalz wurde eine deutliche Aktivierung der Honigdiastase erzielt (siehe später).

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Essigsäure ccm	Wasser ccm	Aufgefüllt zu 16 ccm mit Wasser ccm	Aufgefüllt zu 16 ccm mit 8%-iger Invertzuckerlösung ccm	Aufgefüllt zu 16 ccm mit Wasser + 0,5 ccm 1/10N.-NaCl ccm
2,8	5	0,5	0	7,2 + 0,5	7,2 + 0,5	7,2 + 0,5
2,1	5	0,5	0	7,9 + 0,5	7,9 + 0,5	7,9 + 0,5
1,7	5	0,5	0	8,3 + 0,5 limes	8,3 + 0,5 limes	8,3 + 0,5
1,3	5	0,5	0, limes	8,7 + 0,5	8,7 + 0,5	8,7 + 0,5 limes
1,0	5	0,5	0	9,0 + 0,5	9,0 + 0,5	9,0 + 0,5
D. Z.	—	—	29,4	23,8	23,8	29,4

Ferner möchte ich unter diesen methodologischen Anmerkungen noch eine Beobachtung anführen, die ich wahrnahm, wenn die Reaktionsgemische nach der Digestion längere Zeit bei Eistemperatur aufbewahrt wurden. Da der Endpunkt der Reaktion bei Lampenlicht nicht deutlich zu erkennen ist, so sah ich mich im Winter durch den plötzlichen Eintritt der Dämmerung bisweilen genötigt, die Prüfung mit

[1]) Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, 3, Abschnitt: Fermente.

Jod erst am anderen Morgen vorzunehmen. Nach einstündigem Einwirken des Fermentes auf die Stärkelösung wurden die Reagensgläschen über Nacht in Eis stehen gelassen und die Reaktion bei Tageslicht zu Ende geführt. Durch Versuche stellte ich fest, daß die auf diese Weise ermittelten Ergebnisse nicht unerheblich von den ordnungsgemäß ermittelten Diastasezahlen abwichen. Stärke, die beim sofort durchgeführten Versuch unverdaut war (Blaufärbung), war in den entsprechenden Gläsern merklich schon nach einstündigem, ganz bedeutend nach fünfzehnstündigem Belassen in Eis bis zum Amylo- und Erythrodextrin (Rotfärbung) abgebaut.

Fermentlösung ccm	Sofort geprüft	Nach 1 Stunde geprüft	Fermentlösung ccm	Sofort geprüft	Nach 15 Stunden geprüft
2,8	+	+	6,0	+	+
2,1	+	+	4,6	+	+
1,7	+	+	3,6	limes	+ hellrot
1,3	limes	+ rot	2,8	—	+ rot
1,0	—	limes (blau)	2,1	—	+ dunkelrot
			1,7	—	limes
D. Z.	29,4	38,5	D. Z.	10,9	23,8

Hieraus geht hervor, daß die einmal eingeleitete Reaktion trotz der niedrigen Temperatur nicht völlig zum Stillstand gebracht wurde. Es ist daher ratsam, die mit Ferment und Substrat beschickten Gläschen nicht allzulange im Eis stehen zu lassen, sondern die Reaktion möglichst bald nach der Digestion zu beenden.

II. Die Wirkungsweise der Honigdiastase.

Untersuchungen über die Wirkungsweise des diastatischen Ferments im Honig liegen bislang nicht vor. Könnte wissenschaftliches Interesse allein schon Anregung zu solchen Studien geben, so ist es ebenso für eine einwandfreie Ermittelung der Diastasemenge im Honig unumgänglich notwendig, die Eigenschaften dieses Fermentes kennen zu lernen, die günstigsten Verhältnisse zu erforschen, unter denen es wirkt usw. Ohne solche Kenntnisse ist es unter Umständen unmöglich, zu richtigen Resultaten zu gelangen, wie ich später zeigen werde. Ferner können die Ergebnisse solcher Studien für eine rationelle Honiggewinnung verwertet werden. Wie hoch Honig ohne Schädigung der biologischen bezw. ernährungsphysiologischen Eigenschaften erhitzt werden darf, ist beispielsweise eine Frage, die zurzeit als völlig ungeklärt gelten kann.

Im folgenden habe ich versucht, festzustellen, in welcher Weise die Diastase des Honigs beeinflußt wird durch:

1. Chlornatrium, 2. die Reaktion (Säuren und Alkalien), 3. die Alkoholfällung, 4. Filtration, 5. Dialyse, 6. Schütteln und 7. Erhitzen.

1. Der Einfluß des Chlornatriums.

Die Diastasen verschiedener Herkunft verhalten sich Neutralsalzen gegenüber sehr verschieden. So stellt nach Starkenstein[1]) Kochsalz einen Aktivator für Leberdiastase dar, während beispielsweise die Diastase des Hafers so gut wie gar nicht

[1]) Biochem. Zeitschr. 1910, 24, 211.

durch Chlornatrium beeinflußt wird. Nach diesem Forscher braucht das Fermentmolekül zu seiner Aktivierung eine bestimmte Salzmenge, um das Optimum seiner Wirkung zu erreichen. Die aktivierende Rolle spielt nach Wohlgemuth beim Chlornatrium das Chlor-Ion.

Nach Browne[1]) sowie Lendrich und Nottbohm[2]) enthalten Honige zuweilen nicht unerhebliche Mengen (über 0,4 %) Chlornatrium. Ich hielt es daher für angebracht, zu untersuchen, ob überhaupt bezw. in welcher Weise das Honigferment einer Beeinflussung durch dieses Neutralsalz unterliegt. Die Untersuchungen, die an verschiedenen Honigsorten ausgeführt wurden, zeigten übereinstimmend folgendes Ergebnis.

Während in der Konzentration $^1/_{1000}$ N.-Chlornatrium 0,5 ccm keinen Einfluß ausübten, war ein solcher in der Konzentration $^1/_{100}$ N. unverkennbar. Bei $^1/_{10}$ N. und $^1/_5$ N. erreichte die aktivierende Kraft ihr Optimum, dagegen war bei $^1/_1$ N. schon ein geringer Rückgang festzustellen.

Ich greife ein Beispiel heraus:

Fermentlösung ccm	Kontrolle Wasser ccm	0,5 ccm Chlornatriumlösung				
		$^1/_{1000}$ N.	$^1/_{100}$ N.	$^1/_{10}$ N.	$^1/_5$ N.	$^1/_1$ N.
3.6	0,5 +	+	+	+	+	+
2,8	0,5 +	+	+	+	+	+
2,1	0,5 (blau) limes	(violett) limes	(rot) +	(gelbrot) +	(gelbrot) +	(rot) +
1,7	0,5 —	—	(blauviolett) limes	(rot) +	(rot) +	(violett) limes
1,3	0,5 —	—	—	(blau) limes	(blau) limes	—
1,0	0,5 —	—	—	—	—	—
D. Z.	17,9	17,9	23,8	29,4	29,4	23,8

Hiernach wird die Honigdiastase schon durch geringe Spuren Kochsalz (0,5 ccm $^1/_{100}$ N. = 0,00029 g Chlornatrium) im günstigen Sinne beeinflußt. Bei Innehaltung optimaler Verhältnisse war es also möglich, die Diastasezahl von 17,9 auf 29,4 zu steigern.

Angesichts dieses Befundes schien es mir geboten, bei der Ausführung der quantitativen Diastasebestimmung diesen Faktor zu berücksichtigen.

Könnte einerseits zur Vortäuschung einer kräftigeren Diastasewirkung Chlornatrium zugesetzt werden, so ist andererseits, wie schon erwähnt, ein solcher Gehalt desselben gefunden worden, daß dadurch eine erhebliche Beeinflussung der diastatischen Kraft als sicher anzusehen ist. Wird bei der Bestimmung der Diastasezahl 0,5 ccm $^1/_{10}$ N.-Chlornatrium hinzugesetzt, so wird stets die optimale Wirkung entfaltet; ein schon vorhandener Chlornatriumgehalt, wie er in Honigen, besonders in Hawaihonigen, beobachtet worden ist, ändert hieran nichts.

Die Studien über die Beeinflussung der Diastase durch Chlornatrium wurden unter ganz besonderen Vorsichtsmaßregeln angestellt: einmal wirkte das Ferment bei allen 6 Versuchen praktisch gleiche Zeit ein, indem alle Gläschen in Eis gestellt

[1]) Zeitschr. d. Vereins der deutschen Zuckerindustrie 1908, **45**, 751.

[2]) Diese Zeitschrift 1911, **22**, 633.

wurden bis zum unmittelbaren Beginn der Digestion und nach Beendigung derselben; ferner wurde der ganze Versuch bei genau derselben Temperatur gehalten, und schließlich wurden die Gläschen mit korrespondierenden Fermentmengen stets nebeneinander mit Jod versetzt, um Unterschiede hinsichtlich der Jodstärkereaktion genau wahrnehmen zu können.

Soweit die praktische Bedeutung des Chlornatriums für die Bestimmung der Diastasezahl. Die weiter in dieser Richtung ausgeführten Versuche ergaben, daß durch einen größeren Zusatz von Chlornatrium die Enzymwirkung gehemmt und sogar aufgehoben wird.

Die Diastasezahl sank bei einem Zusatz von

1 % Chlornatrium zu der Lösung 10 g : 100 ccm auf 23,8
2 „ „ „ „ „ 10 „ : 100 „ „ 8,3
3 „ „ „ „ „ 10 „ : 100 „ „ 0

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Kontrolle	Zusatz von Chlornatrium		
			1%	2%	3%
10	1	+	+	+	—
10	2,5	+	+	+	—
10	5	+	+	+	—
7,7	5	+	+	+	—
6,0	5	+	+	+	—
4,6	5	+	+	limes	—
3,6	5	+	+	—	—
2,8	5	+	+	—	—
2,1	5	+	+	—	—
1,7	5	+	limes	—	—
1,3	5	limes	—	—	—
1,0	5	—	—	—	—
D. Z.	—	29,4	23,8	8,3	0

2. Verhalten der Honigdiastase gegen Säuren und Alkalien, ihre Differenzierung vom Ptyalin des Speichels.

Sobald der Gehalt an Diastase im Honig zur Beurteilung des letzteren herangezogen wird, muß damit gerechnet werden, daß dieses Ferment, welches ja billig und in genügender Menge im Ptyalin des Speichels zur Verfügung steht, zum Zwecke der Täuschung künstlich zugesetzt wird. Man müßte also darauf bedacht sein, Untersuchungsmethoden auszuarbeiten, um ein solches Beginnen zu vereiteln und im Keime zu unterdrücken. Einmal liegt der Gedanke nahe, daß die Serologie hier erfolgreich eingreifen könnte, ist es doch sogar gelungen, auf serologischem Wege ober- und untergärige Hefe, die reich an Fermenten sind, voneinander zu unterscheiden und beide wiederum von Kartoffelhefe[1]). Der zweite Weg ist jedoch einfacher und macht sich die Tatsache zunutze, daß die einzelnen Diastasearten nur bei einer ganz bestimmten Acidität bezw. Alkalität wirken, daß also ihr Verhalten den einzelnen Säuren und Alkalien gegenüber sehr verschieden ist. So ist das amylolytische Ferment des Hafers in neutraler und alkalischer Lösung wirksam, in saurer dagegen unwirksam,

[1]) Chem. Zentralbl. 1911, 991.

wie Scheunert und Grimmer[1]) zeigten, während andererseits Honigdiastase, wie aus nachstehend beschriebenen Versuchen hervorgeht, bei schwach saurer Reaktion ihre günstigste Wirkung entfaltet.

Der Hauptzweck dieser Untersuchung war, die Acidität bezw. Alkalität zu ermitteln, bei welcher die Diastase des Honigs am günstigsten wirkt, ferner ihre Empfindlichkeit gegen verschiedene Säuren und Alkalien, ihr Verhalten in neutralem Medium zu studieren, um schließlich der Frage näher treten zu können, ob durch ein solch verhältnismäßig einfaches Verfahren eine Unterscheidung vom Ptyalin des Speichels gelingt.

Zwecks Herstellung der Fermentlösung wurden 50 g Honig in destilliertem Wasser gelöst, gegen Lackmus durch $^1/_{20}$ N.-Natriumcarbonatlösung genau neutralisiert und bei 15° C im 500 ccm-Kolben bis zur Marke aufgefüllt. Die Diastasewirkung wurde ermittelt bei neutraler, saurer und alkalischer Reaktion und vergleichsweise in der nicht neutralisierten Honiglösung mit ihrem natürlichen Säuregehalt.

a) Anorganische Säuren.

Nach dem Neutralisieren der in dem Honig befindlichen Säure machte sich eine deutliche Abnahme der amylolytischen Kraft bemerkbar, die auch durch Zugabe von 0,5 ccm $^1/_{1000}$ N.-Salzsäure wie Schwefelsäure nicht ganz aufgehoben wurde. Während der Zusatz von $^1/_{100}$ N.-Schwefelsäure die ehemalige Wirkung wieder herstellte, zeigte Salzsäure in dieser Konzentration ein besonderes Verhalten, insofern der ursprüngliche Effekt noch übertroffen wurde. 0,5 ccm $^1/_{10}$ N.-Salzsäure wie Schwefelsäure hoben die fermentative Wirkung völlig auf.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Zusatz von							
		0,5 ccm Wasser, Lösung		0,5 ccm Salzsäure			0,5 ccm Schwefelsäure		
		natürlich sauer	neutralisiert	$^1/_{1000}$ N.-	$^1/_{100}$ N.-	$^1/_{10}$ N.-	$^1/_{1000}$ N.-	$^1/_{100}$ N.-	$^1/_{10}$ N.-
10	1	+	+	+	+	—	+	+	—
10	2,5	+	+	+	+	—	+	+	—
10	5,0	+	+	+	+	—	+	+	—
7,7	5,0	+	+	+	+	—	+	+	—
6,0	5,0	+	+	+	+	—	+	+	—
4,6	5,0	+	+	+	+	—	+	+	—
3,6	5,0	+	limes	+	+	—	+	+	—
2,8	5,0	+	—	limes	+	—	limes	+	—
2,1	5,0	limes	—	—	+	—	—	limes	—
1,7	5,0	—	—	—	limes	—	—	—	—
1,3	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—
D. Z.	—	17,9	10,9	13,9	23,8	0	13,9	17,9	0

b) Organische Säuren.

Für organische Säuren ergeben sich etwas verschiedene Resultate. Oxalsäure, Ameisensäure und Essigsäure beeinflussen die Reaktion in der Konzentration $^1/_{1000}$ N. gar nicht oder unerheblich (Oxalsäure). Für Ameisensäure und Oxalsäure gilt in der Konzentration $^1/_{100}$ N. das für die $^1/_{100}$ N.-Schwefelsäure Gesagte. Dagegen wirkt Essigsäure im günstigen Sinne bei derselben Konzentration und noch etwas energischer

[1]) Vgl. Klempin, Biochem. Zeitschrift 1908, **10**, 204.

bei der von $^1/_{50}$ N. Sie zeichnet sich von allen geprüften Säuren und Alkalien noch dadurch aus, daß ein Zusatz von 0,5 ccm $^1/_{10}$ N.-Essigsäure zwar eine Hemmung, aber keine vollständige nach sich zieht.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Zusatz von 0,5 ccm: Wasser, neutrale Lösung	Ameisensäure $^1/_{1000}$N.-	Ameisensäure $^1/_{100}$N.-	Ameisensäure $^1/_{10}$ N.-	Oxalsäure $^1/_{1000}$N.-	Oxalsäure $^1/_{100}$N.-	Oxalsäure $^1/_{10}$ N.-	Essigsäure $^1/_{1000}$N.-	Essigsäure $^1/_{100}$N.-	Essigsäure $^1/_{50}$ N.-	Essigsäure $^1/_{25}$ N.-	Essigsäure $^1/_{10}$ N.-
10	1	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
10	2,5	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
10	5,0	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
7,7	5,0	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
6,0	5,0	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
4,6	5,0	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
3,6	5,0	limes	limes	+	—	+	+	—	limes	+	+	+	+
2,8	5,0	—	—	+	—	limes	+	—	—	+	+	+	limes
2,1	5,0	—	—	limes	—	—	limes	—	—	+	+	limes	—
1,7	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	limes (blau)	limes (violettblau)	—	—
1,3	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,0	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D. Z.		10,9	10,9	17,9	0	13,9	17,9	0	10,9	23,8	23,8	17,9	13,9

c) Alkalien.

Die drei Alkalien Natriumcarbonat, Natronlauge und Bariumhydroxyd beeinträchtigen die Honigdiastase wenig in der Konzentration $^1/_{1000}$ N., bei $^1/_{100}$ N. wird die Wirkung dagegen energisch gehemmt, ja fast aufgehoben. Bei der Alkalität $^1/_{10}$ N. war in allen Fällen die Wirkung = 0. Am wenigsten schädigend für die Honigdiastase ist Soda, dann Ätznatron und zuletzt Barytwasser.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Zusatz von 0,5 ccm: Wasser, neutrale Lösung	Bariumhydroxyd $^1/_{1000}$ N.-	Bariumhydroxyd $^1/_{100}$ N.-	Bariumhydroxyd $^1/_{10}$ N.-	Natronlauge $^1/_{1000}$ N.-	Natronlauge $^1/_{100}$ N.-	Natronlauge $^1/_{10}$ N.-	Natriumcarbonat $^1/_{1000}$ N.-	Natriumcarbonat $^1/_{100}$ N.-	Natriumcarbonat $^1/_{10}$ N.-
10	1	+	+	—	—	+	+	—	+	+	—
10	2,5	+	+	—	—	+	limes	—	+	+	—
10	5,0	+	+	—	—	+	—	—	+	limes	—
7,7	5,0	+	+	—	—	+	—	—	+	—	—
6,0	5,0	+	limes	—	—	+	—	—	+	—	—
4,6	5,0	+	—	—	—	limes	—	—	+	—	—
3,6	5,0	limes	—	—	—	—	—	—	limes	—	—
2,8	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,1	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,7	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,3	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D. Z.		10,9	6,5	0	0	8,3	1	0	10,9	2,5	0

Als Nutzanwendung ergibt sich hieraus, daß die Neutralisation der natürlich vorhandenen Säure sehr vorsichtig mit $^1/_{20}$ N.-Natriumcarbonatlösung vorzunehmen ist, daß der Essigsäure insofern eine Sonderstellung zuzuerkennen ist, als sie bei einem Zusatz von 0,5 ccm $^1/_{50}$ N. am günstigsten wirkt, bei stärkerer Konzentration der schädigende Einfluß aber zurücktritt.

Der Hinweis, daß der Säuregehalt im Honig doch großen Schwankungen unterliegt, wird genügen, um die Maßnahme zu rechtfertigen, stets die Diastasezahl bei ein und derselben Acidität auszuführen. Um jedoch zu zeigen, was für eine Bedeutung dem Säuregrad bei der Bestimmung zukommt, und daß ohne Berücksichtigung dieses Umstandes ein direkt falsches Ergebnis erzielt werden kann, möchte ich ein praktisches Beispiel anführen. Der Honig 39 zeigte 0,5 % Säure (Normal-Alkali für 100 g Honig). Das Gesamtvolumen wurde wie immer auf 16 ccm gebracht.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Honiglösung natürlich sauer	10 g Honig neutralisiert, aufgef. zu 100 ccm Zusatz von	
			0,5 ccm $^1/_{50}$ N.-Essigsäure	0,5 ccm $^1/_{50}$ N.-Essigsäure und 0,5 ccm Chlornatriumlösung
10	5,0	+	+	+
7,7	5,0	limes	+	+
6,0	5,0	—	+	+
4,6	5,0	—	+	+
3,6	5,0	—	limes	+
2,8	5,0	—	—	limes
2,1	5,0	—	—	—
D. Z.		5	10,9	13,9

Eine Frage von großer Wichtigkeit ist die Unterscheidung der Honigdiastase vom Ptyalin des Speichels. Es ist nicht von der Hand zu weisen, daß der Diastasezahl an Bedeutung verlieren müßte, wenn eine solche Differenzierung nicht gelingen würde. Andererseits ist geltend zu machen, daß der Diastasegehalt des Honigs eng begrenzt ist, und daß die soeben beschriebenen Untersuchungsergebnisse uns tatsächlich instand setzen, einen etwaigen Zusatz von Ptyalin in leichter Weise als solchen zu erkennen. Es kann als feststehende Tatsache gelten, daß die Diastase des Speichels äußerst empfindlich gegen Säuren (wie auch Alkalien) ist, und zwar in viel höherem Maße als die Honigdiastase. So wird Speicheldiastase nach Wohlgemuth[1]) durch 0,5 ccm $^1/_{800}$ N.-Salzsäure in ihrer Wirkung gehemmt bezw. geschädigt, während Honigdiastase, wie oben gezeigt wurde, durch einen Zusatz von 0,5 ccm $^1/_{100}$ N.-Salzsäure zur neutralen Lösung eine wesentliche Steigerung der amylolytischen Kraft erfährt. Durch 0,5 ccm $^1/_{10}$ N.-Essigsäure tritt ebenfalls, wie ich feststellte, eine weitgehende Schädigung des Ptyalins, aber eine erhebliche Aktivierung der honigdiastatischen Kraft ein.

Als Beleg führe ich folgenden Versuch an:

20 g des Kunsthonigs 44 (D. Z. = 0) wurden in Wasser gelöst, genau neutralisiert und in solcher durch Vorversuche ermittelten Menge Ptyalin zugesetzt, daß sich eine für Naturhonig in Betracht kommende Diastasezahl ergab; dann wurde auf

[1]) Biochem. Zeitschrift 1908, **10**, 1.

200 ccm aufgefüllt. Die weitere Anordnung wie das verschiedene Verhalten des Ptyalins und der Honigamylase gegenüber Essigsäure kommt in der Tabelle zum Ausdruck.

Ferment-lösung ccm	Stärke-lösung	Kunsthonig ohne Zusatz	Kunsthonig + Ptyalin		Heidehonig	
			neutralisiert	essigsaure Lösung	neutralisiert	essigsaure Lösung
10	1	—	+	+	+	+
10	2,5	—	+	+	+	+
10	5,0	—	+	+	+	+
7,7	5,0	—	+	+	+	+
6,0	5,0	—	+	+	+	+
4,6	5,0	—	+	+	+	+
3,6	5,0	—	+	+	limes	+
2,8	5,0	—	+	limes	—	+
2,1	5,0	—	+	—	—	+
1,7	5,0	—	+	—	—	limes
1,3	5,0	—	limes	—	—	—
D. Z.		0	29,4	13,9	10,9	23,8

Sollte eine abnorm hohe Diastasezahl im Honig gefunden werden, oder würde ein Honig trotz seines faden Geschmackes einen beträchtlichen Gehalt an Diastase aufweisen, so würde die Diastasezahl festzustellen sein: einmal in der neutralisierten Honiglösung, ein zweites Mal, wie üblich, bei essigsaurer Reaktion. Ergäbe die erstere Bestimmung eine höhere Zahl als die zweite, so würde damit der Verdacht auf Zusatz von artfremder (Speichel-) Diastase bestätigt sein.

In Anbetracht einer solchen einfachen Unterscheidung ist es wohl von vornherein als unwahrscheinlich anzusehen, daß eine Verfälschung in dieser Richtung vorgenommen werden wird.

3. Der Einfluß der Alkoholfällung.

Die Isolierung der Eiweißstoffe und somit auch der Honigfermente wurde von Langer[1]) in folgender Weise vorgenommen: 10 g Honig wurden in 10 ccm Wasser gelöst, filtriert und das Filter mit 5 ccm Wasser nachgespült. Das klare Filtrat wurde mit 150 ccm 96 %-igem Alkohol vereinigt, gut gemischt und 24 Stunden lang stehen gelassen. Der Niederschlag wurde quantitativ auf einem Filter gesammelt und gewogen.

Moreau[2]) arbeitete ebenfalls mit den durch Alkohol gefällten Enzymen, indem er das Reduktionsvermögen der Abbauprodukte feststellte. Der in echten Honigen von ihm gefundene Gehalt an reduzierbaren Stoffen (ausgedrückt in Glykose) schwankt von 0,60—3,68 %.

Die Methode der Alkoholfällung zur Isolierung der Enzyme wandte ich früher ebenfalls an für die fermentative Kohlenhydratspaltung (Inulin, Lactose, Saccharose usw.), erzielte jedoch auf diesem Wege trotz großer Bemühungen teilweise unbefriedigende Resultate (Inulin).

[1]) Archiv f. Hygiene 1909, 71, 312.

[2]) Annales des Falsifications 1911, No. 28 u. 29.

Es schien mir daher angezeigt, zu untersuchen, in welcher Weise das amylolytische Ferment des Honigs durch die Alkoholfällung beeinflußt wird.

Die von mir angewandte Versuchsanstellung war folgende: 10 g Honig wurden in wenig Wasser gelöst, quantitativ in ein Zentrifugierglas von 100 ccm Inhalt mit möglichst wenig Wasser übergeführt und die Enzyme mit 96%-igem Alkohol (5-fache Menge der wässerigen Flüssigkeit) gefällt. Es wurde scharf abzentrifugiert (1/4 Stunde bei 3000 Umdrehungen in der Minute), einmal sofort nach dem Ausflocken des Niederschlages (nach 10 Minuten), ein anderes Mal nach 24-stündigem Absitzenlassen. Die überstehende, völlig klare, alkoholische Flüssigkeit wurde abgegossen, der zurückbleibende Niederschlag in destilliertem Wasser fein verteilt, mit 1/20 N.-Sodalösung neutralisiert, auf 100 ccm aufgefüllt und sofort die Diastasezahl bestimmt. Oben angeführte Maßnahmen, Fällung und Abscheidung im Zentrifugierglas, genaue Abmessung der Alkoholeinwirkung, gestatteten eine völlig quantitative Durchführung der Versuche.

Da diese übereinstimmende Resultate ergaben, so beschränke ich mich auf die Wiedergabe eines Beispiels. Als Kontrolle wurde in einer besonderen Lösung die Diastasezahl in der üblichen Weise bestimmt.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Lösung 10 g : 100 ccm (Kontrolle)	Dauer der Alkoholfällung	
			1/2 Stunde	24 Stunden
10	1,0	+	+	+
10	2,5	+	+	+
10	5,0	+	+	limes
7,7	5,0	+	+	—
6,0	5,0	+	+	—
4,6	5,0	+	+	—
3,6	5,0	+	limes	—
2,8	5,0	+	—	—
2,1	5,0	+	—	—
1,7	5,0	limes	—	—
1,3	5,0	—	—	—
D. Z.		23,8	10,9	2,5

Aus der Tabelle geht hervor, daß selbst bei kurzer Einwirkung des Alkohols (Gesamtdauer 1/2 Stunde) schon eine recht erhebliche Beeinträchtigung der diastatischen Kraft des Honigs eintrat. Dauert die Einwirkung jedoch 24 Stunden, so war die amylolytische Wirksamkeit auf ein Minimum reduziert.

4. Einfluß der Filtration.

Die Prüfung auf Anwesenheit von Diastase geschieht nach Auzinger in unfiltrierten Honiglösungen.

Im Gegensatz hierzu wendet Witte[1]) filtrierte Lösungen (1+2) an.

Bei meinen Versuchen fiel mir auf, daß zuweilen in den filtrierten Fermentlösungen eine wesentlich niedrigere Diastasezahl gefunden wurde als in unfiltrierten, in anderen Fällen schien die Filtration der Lösungen ohne Einfluß auf die amylo-

[1]) Diese Zeitschrift 1911, 21, 305.

lytische Wirksamkeit zu sein. Eine Klarstellung dieses Umstandes hielt ich für notwendig zur Erzielung einwandfreier Zahlen.

Es wurde der Einfluß des Filtrierens von Lösungen ungleichen Fermentgehaltes durch verschiedene Filter (Faltenfilter, quantitative Filter, Berkefeld'sche Kieselgurkerzen) studiert. Für die Versuche wurde nicht das erste Filtrat verwendet, sondern die Fermentlösung mehrere Male zurückgegossen, bis eine klare oder leicht opaleszierende Flüssigkeit erhalten wurde. Aus den Versuchsbeispielen ist ersichtlich, daß die Diastasewirkung der Honiglösungen erheblich durch Filtrieren herabgemindert werden kann, daß es sogar in manchen Fällen gelingt, die Diastase quantitativ zurückzuhalten (Beispiel I).

Diese Erscheinung war regelmäßig bei Honigen zu beobachten, die mit Wasser eine trübe Lösung ergaben. Einzelne Honige zeigten jedoch auch nach längerer Filtration eine nur verhältnismäßig geringe Einbuße der Fermentwirkung (Beispiel II).

Eine Erklärung dieses widersprechenden Befundes ist darin zu suchen, daß die die amylolytische Wirkung auslösenden Eiweißsubstanzen des Honigs in mehr oder minder gequollenem Zustande vorhanden sein werden und somit einmal glatt filtrieren, ein anderes Mal durch das Filter zurückgehalten werden. Ein erhöhter Stickstoffgehalt im Filterrückstand nach dem Filtrieren und eine entsprechende Abnahme im Filtrat wäre aber nicht beweisend für die Annahme der Eiweißnatur der Diastase, da die an Stickstoff reichen Pollenkörner mechanisch zurückgehalten werden, und doch nicht als die Hauptträger der Diastasewirkung angesehen werden können.

Beispiel I					Beispiel II			
Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Lösung unfiltriert	opaleszierende Lösung zweimal filtriert	klare Lösung nach weiterem Filtrieren	Fermentlösung ccm	Lösung unfiltriert	nach 2-maligem Filtrieren	nach 6-maligem Filtrieren
10	1,0	+	+	—	10	+	+	+
10	2,5	+	+	—	7,7	+	+	+
10	5,0	+	+	—	6,0	+	+	+
7,7	5,0	+	+	—	4,6	+	+	+
6,0	5,0	+	+	—	3,6	+	limes	limes
4,6	5,0	+	+	—	2,8	+	—	—
3,6	5,0	+	limes	—	2,1	limes	—	—
2,8	5,0	+	—	—	1,7	—	—	—
2,1	5,0	+	—	—				
1,7	5,0	limes	—	—				
D. Z.		23,8	10,9	0	D. Z.	17,9	10,9	10,9

Wenn auch eine Beeinflussung des Resultates durch Filtrieren bei der Diastaseprobe nach Auzinger als ausgeschlossen gelten kann wegen des zu hohen Gehaltes an Ferment (10 ccm der Lösung 1+2) und der sehr niedrigen Substratmenge (0,01 g Stärke), so sind doch in Berücksichtigung obiger Darlegungen für die quantitative Diastasebestimmung unfiltrierte Lösungen zu verwenden.

Wie sehr die beiden zuletzt behandelten Faktoren, Alkoholfällung und Filtration, das Resultat entstellen können, möchte ich an den Untersuchungen unseres französischen Kollegen Moreau[1]) zeigen. Dieser Forscher bemühte sich, einen Einblick in die

[1]) Annales des Falsifications 1911, No. 28 u. 29.

Mengenverhältnisse der dem Honig innewohnenden Fermente zu erhalten. Die durch Alkohol gefällten Enzyme nahm er mit Wasser auf, welches erhitzt und wieder abgekühlt war, filtrierte diese trübe Lösung und erhielt so eine klare Fermentlösung (une solution limpide de ferments). Um stets unter gleichen Bedingungen zu arbeiten, fügt er nach Neutralisation 1,5 ccm 1%-ige Ameisensäure hinzu und läßt diese Lösung auf Stärke während 24 Stunden einwirken. Er erwähnt noch, daß das Reduktionsvermögen sehr schwach war.

Zur Nachprüfung dieser Methodik bediente ich mich folgender Versuchsanordnung:

I. In der Lösung 10 g : 100 ccm wurde in üblicher Weise der Diastasegehalt ermittelt (Kontrolle).

II. 10 g Honig wurden gelöst, mit Alkohol gefällt, nach dem Ausflocken des Niederschlags (10 Minuten) zentrifugiert, der Niederschlag mit destilliertem Wasser aufgenommen, neutralisiert, auf 100 ccm aufgefüllt, in der trüben Lösung sofort die Diastasezahl festgestellt.

III. Der Alkoholniederschlag von 10 g Honig wurde mit destilliertem Wasser aufgenommen, die trübe Lösung durch ein quantitatives Filter filtriert, sorgfältig nachgewaschen, das klare Filtrat neutralisiert, 1,5 ccm 1%-ige Ameisensäure zugefügt, auf 100 ccm aufgefüllt und der Diastasegehalt festgestellt ohne Zusatz von Säure und Kochsalz bei einem Gesamtvolumen von 16 ccm.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	I	II	III	Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	I	II	III
10	1,0	+	+	+	2,8	5,0	+	limes	—
10	2,5	+	+	+	2,1	5,0	+	—	—
10	5,0	+	+	limes	1,7	5,0	+	—	—
7,7	5,0	+	+	—	1,3	5,0	limes	—	—
6,0	5,0	+	+	—	1,0	5,0	—	—	—
4,6	5,0	+	+	—					
3,6	5,0	+	+	—	D. Z.	—	29,4	13,9	2,5

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die ursprüngliche Wirkung infolge der nachteiligen Beeinflussung durch Alkoholfällung und Filtration fast auf den 12. Teil reduziert worden war. Selbst bei optimaler Zugabe von Essigsäure und Kochsalz wurde nie eine höhere Diastasezahl als 5,0 erreicht. Bei Honigproben mit niedrigerem Fermentgehalt (Diastasezahl : 17,9) war oft nach oben beschriebener Behandlung eine amylolytische Wirkung nicht mehr nachzuweisen.

5. Einfluß der Dialyse.

Mit dem Einfluß der Dialyse auf die Fermentwirkung haben sich mehrere Forscher[1]) beschäftigt. Es konnte festgestellt werden, daß z. B. Leberdiastase durch Dialyse vollständig inaktiviert, durch Zusatz von Kochsalz die alte Wirksamkeit wieder erreicht wurde. Für Ptyalin (Speicheldiastase) wurde das nicht ganz bestätigt. Die Wirkung war nach der Dialyse zwar etwas vermindert, konnte aber niemals völlig aufgehoben werden.

[1]) Biochem. Zeitschrift 1910, 24, 211.

Für manche Versuche (Inulase-, Lactase-Nachweis) schien mir eine Trennung der Enzyme von den übrigen Bestandteilen des Honigs, besonders dem Zucker, wünschenswert, um nicht durch das Reduktionsvermögen des letzteren Fehling'scher Lösung gegenüber behindert zu sein. Es kamen also die zur Isolierung der Fermente üblichen Methoden in Betracht: Fällung durch Alkohol, Neutralsalze, Kaolin oder durch Dialyse. Ob letzterer Weg für Honigdiastase gangbar war, mußte zunächst durch Versuche festgestellt werden.

Versuchsanstellung: 20 g Honig wurden in Wasser gelöst, mit $^1/_{20}$ N.-Natriumcarbonatlösung neutralisiert, unter Nachspülen mit destilliertem Wasser quantitativ in zwei Dialysierhülsen (Schleicher und Schüll) übergeführt und 2 mal 24 Stunden gegen 4 mal 2 l destilliertes Wasser dialysiert. Als Kontrolle wurden 20 g Honig in Wasser gelöst im bedeckten Becherglase daneben aufbewahrt; zur Ausschaltung von Bakterienwirkung wurden jeder Probe einige Tropfen (0,5 ccm) Toluol zugefügt.

Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurde der Inhalt der Hülsen, desgleichen die Kontrollösung in 200 ccm-Kolben gebracht, zur Marke aufgefüllt und die Diastasezahl ermittelt. Es ergab sich, daß das Dialysat völlig unwirksam war. In der Kontrollösung hatte der Fermentgehalt etwas abgenommen. (Diastasezahl = 13,9 gegen 17,9.) A priori konnte wohl daran gedacht werden, daß die Konzentration nicht ohne Einfluß wäre, daß die Honigdiastase in einem invertzuckerhaltigen Medium ihre alte Wirksamkeit wieder entfalten würde. Demgemäß wurde die inaktivierte Dialysierflüssigkeit durch Hinzufügen von 8 g Invertzucker zu 100 ccm der Lösung auf die Konzentration der nicht dialysierten Vergleichsflüssigkeit gebracht, jedoch ohne Erfolg, Diastasezahl : 0. Nunmehr versuchte ich festzustellen, ob durch einen Zusatz von Kochsalz eine Reaktivierung der Honigdiastase zu erreichen war. Hierdurch konnte zwar bei weitem nicht die alte Wirksamkeit wieder hergestellt werden, doch war eine Aktisierung des Enzyms durch NaCl unzweideutig zu erkennen.

Fermentlösung ccm	Honiglösung 20 g : 200 ccm		Dialysat nach 48 Stunden		
	sofort untersucht	nach 2-tägiger Aufbewahrung	ohne Zusatz	+ 8% Invertzucker ohne Chlornatrium	+ 0,5 ccm Chlornatrium
10	+	+	—	—	+
10	+	+	—	—	+
10	+	+	—	—	limes
7,7	+	+	—	—	—
6,0	+	+	—	—	—
4,6	+	+	—	—	—
3,6	+	+	—	—	—
2,8	+	limes	—	—	—
2,1	limes	—	—	—	—
1,7	—	—	—	—	—
D. Z.	17,9	13,9	0	0	2,5

6. Einfluß des Schüttelns.

Signe und Sigval Schmidt-Nielsen[1]) beobachteten, daß Labferment sehr leicht durch Schütteln inaktiviert wird; die Inaktivierung war um so stärker, je länger die Schüttelzeit dauerte. Geringe Säuremengen verhinderten die Schüttelinaktivierung.

Die gleiche Erscheinung wiesen Shaklee und Meltzer[2]) für die proteolytischen Fermente, Pepsin, Erepsin, Trypsin, nach.

Über die Inaktivierung des Komplementes (ein an Fermenten reicher Faktor des hämolytischen Systems) berichten Jakoby und Schütze[3]). Sie fanden, daß Meerschweinchenserum durch $1^1/_2$-stündiges Schütteln bei 37^0 oder durch 6-stündiges Schütteln bei 16^0 inaktiviert werden kann.

Wenn auch meine Versuche praktische Ziele zunächst nicht verfolgten, so gab mir dieses interessante Phänomen Veranlassung, das Verhalten des amylolytischen Fermentes im Honig nach dieser Richtung hin zu studieren.

30 g Honig wurden in Wasser gelöst, genau neutralisiert und im 300 ccm-Kolben bis zur Marke aufgefüllt. 200 ccm dieser Lösung wurden nach Zugabe von 1 Vol.-% Toluol im Apparat der Schüttelbewegung ausgesetzt (der Toluolzusatz erfolgte zur Fernhaltung bakterieller Einwirkung, da die Schüttelbewegung auf längere Zeit ausgedehnt werden sollte), der Rest wurde mit 1 ccm Toluol als Kontrollösung aufbewahrt.

Schon in der nach einer halben Stunde entnommenen Probe war keine Spur Diastase nachzuweisen gegenüber einer Diastasezahl von 23,9 beim Kontrollversuch. Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, daß die Inaktivierung nicht durch die Schüttelbewegung als solche hervorgerufen wird, sondern durch den Einfluß des Toluols (Gelbildung). Obgleich Toluol mit Recht als ein die Fermente wenig schädigendes Antisepticum gilt, so äußert es dennoch seine zerstörende Wirkung bei einer so innigen Berührung.

Im übrigen zeigten die ohne Antisepticum durchgeführten Versuche, daß nach 6-stündigem, kräftigem Schütteln bei gewöhnlicher Temperatur eine unverkennbare Schädigung der Honigdiastase eingetreten war.

Worauf dieses Phänomen zurückzuführen ist, ist noch nicht mit Sicherheit aufgeklärt. Die Ansicht, daß die Inaktivierung eine Folge der Alkaliwirkung des Glases sei, ist von Schmidt-Nielsen widerlegt worden. Nach meiner Vermutung zieht das Schütteln an sich eine Denaturierung durch Koagulation der Eiweißkörper nach sich, wodurch eine teilweise Hemmung bezw. Inaktivierung der fermentativen Kraft bedingt wird.

Schüttelversuche bei erhöhter Temperatur wurden nicht angestellt, da dieser Faktor an sich eine Inaktivierung der Honigamylase bewirkt, wie im folgenden Kapitel gezeigt wird.

[1]) Zeitschr. physiol. Chemie, 1909, **60**, H. 6.
[2]) Americ. Journ. Physiol. 1909/10, 23 u. 25. Diese Zeitschrift 1911, **22**, 246.
[3]) Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1910, 733.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Fermentlösung mit Toluolzusatz		Fermentlösung ohne Toluolzusatz			
				Probe I		Probe II	
		geschüttelt 30 Min.	(Kontrolle) ungeschüttelt	geschüttelt 6 Std.	(Kontrolle) ungeschüttelt	geschüttelt 6 Std.	(Kontrolle) ungeschüttelt
10	1,0	—	+	+	+	+	+
10	2,5	—	+	+	+	+	+
10	5,0	—	+	+	+	+	+
7,7	5,0	—	+	+	+	limes	+
6,0	5,0	—	+	+	+	—	+
4,6	5,0	—	+	+	+	—	+
3,6	5,0	—	+	+	+	—	limes
2,8	5,0	—	+	+	+	—	—
2,1	5,0	—	+	limes	+	—	—
1,7	5,0	—	limes	—	limes	—	—
1,3	5,0	—	—	—	—	—	—
D. Z.	—	0	23,8	17,9	23,8	5,0	10,9

7. Der Einfluß des Erhitzens.

Die Fermentwirkung ist in hohem Grade von der Temperatur abhängig. Bei niedriger Temperatur ist sie gering, erreicht ein Maximum bei der sogenannten Optimaltemperatur; über diesen Punkt hinaus wird sie gehemmt, später zerstört. Die Optimaltemperatur der einzelnen Diastasearten ist ganz verschieden, wofür ich einige Belege anführe. Nach Green-Windisch[1]) wirkt die eine Art pflanzlicher Diastase, die Translokationsdiastase, am besten bei 45—50° C, die andere Art, die Sekretionsdiastase, bei 50—55° C. Wesentlich niedriger ist der Optimalpunkt der Speichel- und Pankreasdiastase, nämlich wahrscheinlich bei 38—40°, der Körpertemperatur. Das Optimum der Haferdiastase liegt nach Klempin[2]) bei 40—70°, während die Amylase eines Malzaufgusses[3]) bei 63° ihre größte Wirksamkeit entfaltet.

Das Verhalten der Honigdiastase bei den einzelnen Erhitzungsgraden ist wiederholt der Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen, ohne daß eine Übereinstimmung erzielt wäre.

Marpmann[4]) erwähnt, daß die Enzyme in jedem Bienenhonig so lange nachzuweisen sind, als der Honig bei Temperaturen unter 50° behandelt worden ist.

Utz[5]) schließt sich auf Grund seiner Prüfungen dieser Ansicht an. Nach Auzinger[6]) wird die Honigdiastase bei Temperaturen über 70° zerstört; in einer späteren Abhandlung bezeichnet er 50—60° als Zerstörungstemperatur.

Nach Moreau[7]) wird die Diastasewirkung durch einstündiges Erhitzen bei

[1]) Green-Windisch, Die Enzyme, S. 65 u. f.
[2]) Biochem. Zeitschr. 1908, 10, 204, zit. nach Hofmeister, Scheunert und Grimmer.
[3]) Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme, S. 80.
[4]) Pharm. Ztg. 1903, 48, 1010.
[5]) Zeitschr. öffentl. Chemie 1908, 14, 21—28.
[6]) Diese Zeitschrift 1910, 19, 65 und 353.
[7]) Annales des falsifications 1911, Nr. 28 u. 29.

75—80° beträchtlich herabgesetzt, durch Erhitzen bei 100° schon nach einigen Augenblicken zerstört.

Thöny[1]) erhitzte die Honige bei den Temperaturen 60—100° 45 und 60 Minuten lang und prüfte nach Ausführung der Diastasereaktion nach Auzinger die Verdünnung (1+2) sofort durch Zusatz von Jodlösung. Bei 60—90° traten hellolive, bei 95—97° braunrote Farbtöne ein. Er kommt zu dem Ergebnis, daß die diastatische Wirkung verdünnter Honige bei ziemlich hohen Temperaturen (über 90°) geschädigt wird, daß ferner zur Zerstörung des Fermentes in unverdünnten Honigen eine längere Zeit andauernden Erhitzens bei der Siedetemperatur des Wassers erforderlich sei.

Fiehe und Stegmüller[2]) stellten dagegen fest, daß bei einer Temperatur von 85—90° die Honigdiastase zugrunde geht. Daß diese Temperatur so sehr von Auzingers Befund (50—60°) abweicht, ist nach diesen Autoren durch die verschiedene Versuchsanstellung zu erklären: Auzinger erhitzte die 33 1/3 %-ige Lösung, Fiehe und Stegmüller den unverdünnten Honig.

In Anbetracht dieses verschiedenartigen Verhaltens des Honigs in Substanz und in Lösung, welches ich ebenfalls bei meinen Versuchen beobachtete, werde ich den Einfluß der Temperatur auf Honig im unverdünnten Zustand und auf Honiglösung getrennt behandeln.

a) Der Einfluß des Erhitzens auf unverdünnten Honig.

Je 10 g desselben Honigs wurden einer einstündigen Erhitzung bei 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100° ausgesetzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in Wasser gelöst, neutralisiert, auf 100 ccm aufgefüllt und in der Lösung die Diastasezahl ermittelt. In besonderen Proben von je 10 g wurde die Reaktion nach Fiehe (mit Resorcinsalzsäure) ausgeführt. Sie verlief bei sämtlichen Erhitzungsgraden negativ. Während das diastatische Ferment bis 60° noch keine Einbuße erleidet, wird es bei 65° etwas geschwächt, bei 75—80° fast seiner Wirkung beraubt. Bei den Temperaturen 85, 90, 100° war die Wirkung völlig aufgehoben.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	40°	50°	60°	65°	70°	75°	80°	85°	90°	100°
10	1,0	+	+	+	+	+	+ (helloliv)	+	(violett)	(tiefblau)	—
10	2,5	+	+	+	+	+	+ (helloliv)	+	—	—	—
10	5,0	+	+	+	+	+	+ (dunkeloliv)	limes	—	—	—
7,7	5,0	+	+	+	+	+	+ (rot)	—	—	—	—
6,0	5,0	+	+	+	+	+	limes (blau)	—	—	—	—
4,6	5,0	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
3,6	5,0	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
2,8	5,0	+	+	+	+	limes	—	—	—	—	—
2,1	5,0	+	+	+	limes	—	—	—	—	—	—
1,7	5,0	limes	limes	limes	—	—	—	—	—	—	—
1,3	1,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D. Z.	—	23,8	23,8	23,8	17,9	13,9	6,5	2,5	0	0	0
Reaktion nach Fiehe		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

[1]) Thöny, Mitteil. aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung u. Hygiene, 3, Heft 2.
[2]) Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1912, **40**, 305.

Die Versuche sind mit verschiedenen normalen Honigen angestellt worden, wobei besonders darauf gesehen wurde, daß einmal der Diastasegehalt ein verhältnismäßig hoher war, um jede Änderung der Diastasezahl feststellen zu können, und daß ferner der Wassergehalt 22% nicht überstieg.

Meine Ergebnisse decken sich also mit den Befunden Fiehe's und Stegmüller's (Zerstörungstemperatur 85—90°), stehen aber in gewissem Gegensatz zu den Angaben Thöny's und Auzinger's. Eine Erklärung hierfür ist darin zu erblicken, daß diese Forscher mit der qualitativen Diastaseprobe nach Auzinger arbeiteten, welche ja feinere Ausschläge nicht gibt. Beispielsweise könnte die starke Schädigung, welche die Honigdiastase bei 75° (s. Tabelle: Rückgang der D. Z. von 23,8 auf 6,5) erfährt, mittels dieser Reaktion, auch in der von Fiehe und Stegmüller abgeänderten Form, gar nicht erkannt werden.

Anschließend hieran bin ich der Frage nähergetreten, in welcher Weise das amylolytische Ferment beeinflußt wird, wenn unverdünnter Honig während längerer Zeit bei einer Temperatur unter dem Optimalpunkt erhitzt wird.

Die Versuchsanstellung war dieselbe wie oben angegeben. Die Temperatur betrug 38—40° (Brutschranktemperatur).

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Diastase durch längeres Erhitzen (48 Stunden) des unverdünnten Honigs bei 38—40° keine Schädigung ihrer fermentativen Kraft erleidet.

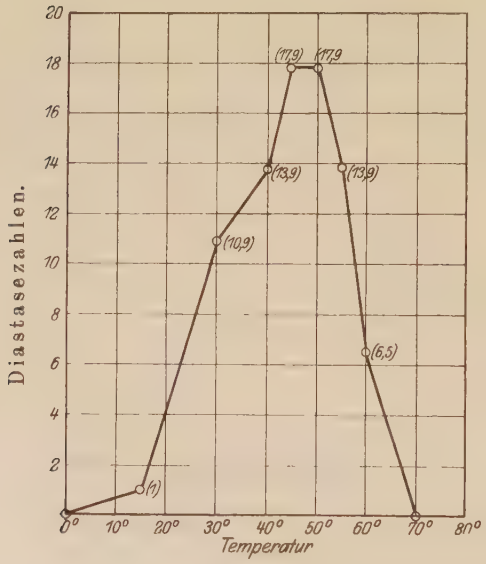
Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Honig unverdünnt erhitzt bei 38—40°			
		6 Stunden	12 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
2,8	5,0	+	+	+	+
2,1	5,0	+	+	+	+
1,7	5,0	+	+	+	+
1,3	5,0	limes	limes	limes	limes
1,0	5,0	—	—	-	—
D. Z.		29,4	29,4	29,4	29,4

b) Einfluß des Erhitzens auf Honiglösungen.

Für die einwandfreie Ermittelung des Diastasegehaltes der Honige ist die Kenntnis des Optimalpunktes in Lösungen (10 g : 100 ccm) sehr wichtig, weil die Enzyme gegen Temperaturen über diesen Punkt hinaus sehr empfindlich sind und schnell der Zerstöruug anheimfallen. Der Vollständigkeit halber habe ich den Einfluß der Temperaturen 0°, 15°, 30°, 40°, 45°, 50°, 55°, 60°, 70° auf das diastatische Ferment festzustellen versucht.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	0°	15°	30°	40°	45°	50°	55°	60°	70°
10	1,0	—	+	+	+	+	+	+	+	—
10	2,5	—	limes	+	+	+	+	+	+	—
10	5,0	—	—	+	+	+	+	+	+	—
7,7	5,0	—	—	+	+	+	+	+	+	—
6,0	5,0	—	—	+	+	+	+	+	limes	—
4,6	5,0	—	—	+	+	+	+	+	—	—
3,6	5,0	—	—	limes	+	+	+	+	—	—
2,8	5,0	—	—	—	limes	+	+	limes	—	—
2,1	5,0	—	—		—	limes	limes	—	—	—
1,7	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D. Z.		0	1	10,9	13,9	17,9	17,9	13,9	6,5	0

Die Tabelle läßt erkennen, daß schon bei 15° eine wenn auch schwache Wirksamkeit der Honigdiastase beobachtet wurde. Von diesem Punkt ab steigt die Diastasewirkung sehr schnell und erreicht bei den Temperaturen 45 und 50° das Optimum. Bei 60° ist die fermentative Kraft stark geschwächt, bei 70° zerstört. Trägt man die in der Tabelle zusammengestellten Diastasezahlen auf die Ordinate, auf die Abszisse die Temperaturen auf und verbindet die erhaltenen Marken, so erhält man die Temperaturkurve der Honigdiastase.



Zum Schluß dieses Kapitels sei noch einer interessanten Beobachtung Erwähnung getan, nämlich des verschiedenen Verhaltens von Honiglösung und unverdünntem Honig bei Temperaturen unter dem Optimalpunkt. Während frühere Versuche dartaten, daß unverdünnter Honig bei 40° in enzymatischer Beziehung gar nicht beeinflußt wird, tritt in Honiglösungen (5, 10, 20 g : 100 ccm) eine Hemmung und nach mehrstündigem Erwärmen bei 38—40° eine völlige Inaktivierung ein.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	(Kontrolle I) vor Beginn des Versuches	Honiglösung erhitzt bei 38—40°			(Kontrolle II) nach 6stündigem Stehen bei Zimmertemperatur
			1 Stunde	3 Stunden	6 Stunden	
10	1,0	+	+	+	—	+
10	2,5	+	+	+	—	+
10	5,0	+	+	+	—	+
7,7	5,0	+	+	+	—	+
6,0	5,0	+	+	+	—	+
4,6	5,0	+	+	+	—	+
3,6	5,0	+	+	limes	—	+
2,8	5,0	+	limes	—	—	+
2,1	5,0	+	—	—	—	+
1,7	5,0	+	—	—	—	+
1,3	5,0	limes	—	—	—	limes
D. Z.		29,4	17,9	10,9	0	29,4

III. Herkunft der Honigdiastase.

Küstenmacher[1]) ließ, um zu erfahren, ob die Diastase des Honigs animalischen oder pflanzlichen Ursprungs sei, eine Pollenaufschwemmung während einer Stunde auf 1 ccm einer 1%-igen Stärkelösung bei 45° einwirken. Auch bei längerem Stehen war die Stärke nicht abgebaut. Da demnach Pollen keine Diastase enthält, so kommt er zu dem Schluß, daß die Honigdiastase animalischer Abstammung sei.

Kammann[2]) hingegen stellte die Gegenwart eines diastatischen Fermentes im Roggenpollen fest.

Da angesichts dieses Widerspruchs die Frage betreffs der Herkunft der Honigdiastase als nicht geklärt gelten kann, so habe ich mich bemüht, eine befriedigende Lösung herbeizuführen.

Versuchsanstellung: Für die Prüfung des Blütenstaubes auf Diastase wurden mehrere Pollenarten herangezogen (Brassica, Helianthus, Crocus, Pinus, Ambrosia). Die Pollen wurden im sterilen Mörser trocken zerrieben, durch allmähliches Hinzusetzen der 10-fachen Menge sterilen Wassers aufgeschwemmt, einige Stunden im Brutschrank belassen, über Nacht im Eisschrank extrahiert, scharf zentrifugiert und die klare Lösung zum Nachweis der Diastase verwendet.

Andererseits wurden Bienen (50 g), die während der Zuckerfütterung im November eigens für unsere Zwecke abgetötet waren, im Mörser nach Zugabe von Sand und Wasser zerrieben, einige Stunden bei 37° digeriert, die Lösung nach dem Erkalten auf 500 ccm aufgefüllt und filtriert. — Bemerken möchte ich bei dieser Gelegenheit, daß der Bienenextrakt, außer für Fermentstudien, zu Injektionen zwecks Gewinnung von Antiserum verwendet wurde. Die diesbezüglichen serologischen Versuche konnten jedoch nicht fortgeführt werden, da infolge der toxischen Wirkung dieser Antigene die Kaninchen starben. — Weitere Versuche über diesen Gegenstand sind für später in Aussicht genommen.

[1]) Biochem. Zeitschr. 1911, **30**, 249.
[2]) Biochem. Zeitschr. **46**, 151.

Nach einer Vorprüfung der amylolytischen Kraft der Extrakte wurde der ganze Versuch (Glas 1—10) in Doppelproben angesetzt und nach den in der Tabelle bezeichneten Zeiten mit Jodlösung geprüft.

Ferment	Stärkelösung (1 %) ccm	Farbton nach Hinzufügen der Jodlösung nach Digestion		
		nach 1stündiger	nach 3stündiger	nach 6stündiger
1. 10 ccm Extrakt aus Pollen von Brassica .	1,0	—	violett —	oliv +
2. 10 „ „ „ „ „ Helianthus	1,0	—	blau —	braun +
3. 10 „ „ „ „ „ Crocus . .	1,0	—	blau —	braun +
4. 10 „ „ „ „ „ Ambrosia	1,0	—	violett —	oliv +
5. 10 „ „ „ „ „ Ambrosia, gekocht (Kontrolle)	1,0	—	blau —	blau —
6. 10 „ „ „ „ von Pinus (unreif)	1,0	—	blau —	blau —
7. Bienenextrakt 1 ccm	1,0	oliv +	oliv +	—
8. „ 1 „ gekocht (Kontrolle)	1,0	blau —	blau —	—
9. „ 1 „	2,5	braun +	oliv +	—
10. „ 1 „	5,0	blau —	oliv +	—

Die Tabelle läßt erkennen, daß sowohl Bienen- wie Pollenextrakt auf fermentativem Wege Stärke abbaute. Die Pollendiastase war im Vergleich zum amylolytischen Ferment der Bienen von recht schwacher Wirksamkeit. (Etwa 1 g Pollen vermochte nicht innerhalb 3 Stunden 0,01 g Stärke zu verdauen). Die Kiefernpollen waren im unreifen Zustande gesammelt und zeigten trotz längerer Digestion keinerlei Fermentwirkung. Wahrscheinlich ist der negative Befund auf diesen Umstand zurückzuführen.

IV. Untersuchung von 75 Honigproben auf ihren Diastasegehalt.

Ist es einerseits von Interesse, mittels der Diastasezahl Aufschluß über den diätetischen Wert der Honige zu erhalten, so ist andererseits der Frage näherzutreten, wieweit die Diastasezahl geeignet ist, eine Verfälschung des Honigs aufzudecken. Um von einem Normalgehalt an Diastase sprechen zu können und sie als Kriterium für die Honigbeurteilung heranzuziehen, wurde eine größere Anzahl Honigproben auf ihren Diastasegehalt untersucht.

1. Ausländische Honige.

Die mir zur Verfügung stehenden überseeischen Honige sind nach ihrer chemischen Zusammensetzung, über die von Lendrich und Nottbohm[1]) berichtet wurde, durchweg als unverfälschte zu begutachten. Zu ihrer Charakterisierung beschränke ich mich auf die Wiedergabe zweier Daten, nämlich der Stickstoffsubstanz und des Nichtzuckers; der Stickstoffsubstanzwert hat insofern eine besondere Bedeutung, als es sich bei den Enzymen stets um eiweißhaltige Substanzen handelt. Es schien mir daher angebracht, festzustellen, ob sich eine Abhängigkeit der Fermentmenge vom Eiweißgehalt nachweisen ließ.

[1]) Diese Zeitschrift 1913, 26, 1—11.

In dieser Hinsicht lehren nachstehende Untersuchungen: Mit einem abnorm geringen Eiweißgehalt (unter 0,2%) geht im allgemeinen ein niedriger, mit einem hohen (Heidehonig) durchweg ein sehr hoher Diastasegehalt parallel. Doch können Honige mit normalen Stickstoffsubstanzwerten auch hohe Diastasezahlen aufweisen (Domingo-, Hawaihonigtau-Honige). Den Nichtzucker führe ich deshalb an, weil ein geringer Wert einen Honig als verdächtig diagnostiziert (vgl. „Entwurf zu Festsetzungen über Honig" S. 14). Absichtlich vermeide ich den Ausdruck „verfälscht", denn nach Angaben von Browne[1]) wie von Lendrich und Nottbohm[2]) erreichen Hawaihonige großenteils nicht einmal den Wert 1,5%.

Es kamen Honigproben aus folgenden Ländern zur Untersuchung: St. Domingo (5 Proben), Hawai (6), Havanna (4), Californien (4), Mexiko (5), Haiti (3), Guatemala (2), Chile (1). Für Überlassung dieses Materials sei den Herren Prof. Dr. Lendrich und Dr. Nottbohm an dieser Stelle bestens gedankt.

a) St. Domingohonige.

Sämtliche 5 Proben, die geschmacklich als recht aromatisch zu bezeichnen waren, lieferten ganz typische Diastasezahlen. Sie zeichneten sich gleichmäßig ohne Ausnahme durch einen sehr hohen Diastasegehalt aus, und zwar stellten die Zahlen die höchsten dar, welche die in- und ausländischen untersuchten Honige überhaupt aufwiesen. Die chemischen Daten sprechen in ihrer Gesamtheit für völlig einwandfreies Material. Ich hebe hervor den Nichtzucker, welcher in allen Fällen verhältnismäßig hoch war. Der Stickstoffgehalt war normal, aber nicht als ein besonders hoher zu bezeichnen.

Fermentlösung ccm	1	2	3	4	5
2,1	+	+	+	+	+
1,7	+	+	+	+	+
1,3	limes	limes	limes	+	+
1,0	—	—	—	limes	limes
D. Z.	29,4	29,4	29,4	38,5	38,5
Stickstoffsubstanz %	0,43	0,54	0,48	0,59	0,51
Nichtzucker %	7,32	5,60	8,33	9,21	7,95

b) Hawaihonige.

Die beiden Proben 6 und 7 gehören dem Typus der Algaroba-Blütenhonige an. Mit den niedrigen Nichtzucker- und Eiweißdaten der beiden ersteren stehen die niedrigen Diastasezahlen in Einklang, welche besagen, daß beide auch in ernährungs-

[1]) Zeitschr. d. Vereins der Deutschen Zuckerindustrie 1908, 45, 751.
[2]) Diese Zeitschrift 1911, 22. 633.

physiologischer Hinsicht gering zu bewerten sind. Honig 8 besaß einen allerdings nicht scharf ausgeprägten Honigtaucharakter; er bildet den Übergang zum Honigtautypus, wie aus dem Nichtzuckerwert hervorgeht. Die hohen Diastasezahlen können für reine Honigtauhonige, die chemisch besonders durch den Nichtzuckerwert und die Drehung, geschmacklich leicht durch ihr eigenartiges, penetrantes Aroma zu erkennen sind, als typisch gelten. Der Nachweis eines übermäßigen Erhitzens, ebenso einer Verfälschung der Honigtauhonige würde durch die quantitative Bestimmung der Diastase ermöglicht werden.

Fermentlösung ccm	Algarobahonig No. 6	Algarobahonig No. 7	Algaroba- + Honigtauhonig No. 8	Honigtauhonig No. 9	Honigtauhonig No. 10	Honigtauhonig No. 11
10	+	+	+	+	+	+
7,7	+	+	+	+	+	+
6,0	limes	+	+	+	+	+
4,6	—	limes	+	+	+	+
3,6	—	—	+	+	+	+
2,8	—	—	limes	+	+	+
2,1	—	—	—	+	+	+
1,7	—	—	—	+	+	limes
1,3	—	—	—	limes	limes	—
D. Z.	6,5	8,3	13,9	29,4	29,4	23,8
Stickstoff-Substanz %	0,16	0,26	0,33	0,34	0,32	0,33
Nichtzucker %	0.52	1,80	4,90	15,31	11,60	14,81

c) Havannahonige.

Die Proben 12 und 13, in chemischer Hinsicht unauffällig, lieferten die Diastasezahlen 13,9 und 10,9. Honig 14 dagegen, der stark verunreinigt war (vgl. S. 15), wies einen hohen Diastasegehalt auf (Diastasezahl: 23,8). Zu berücksichtigen ist, daß dieser Honig auch in chemischer Beziehung, unter anderem bezüglich des Nichtzuckers (8,14 %) und der Stickstoffsubstanz (0,59 %), von den beiden vorhergehenden erheblich abweicht. Bei der qualitativen Prüfung auf Diastase nach Auzinger zeigte die Probe 15 einen positiven Befund. Durch Erwärmen wurde sie verflüssigt und von den verschmutzenden Bestandteilen getrennt. Die hierbei angewandte Temperatur muß wohl eine zu hohe gewesen sein, denn bei der späteren Untersuchung zwecks Feststellung der Diastasezahl war keine Spur amylolytischer Kraft mehr nachzuweisen. Für die Beurteilung der Honige hinsichtlich des Fermentgehalts kommt sie daher nicht in Frage.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	Honig No. 12	Honig No. 13	Honig No. 14	Honig No. 15
10,0	1,0	+	+	+	—
10,0	2,5	+	+	+	—
10,0	5,0	+	+	+	—
7,7	5,0	+	+	+	—
6,0	5,0	+	+	+	—
4,6	5,0	+	+	+	—
3,6	5,0	+	limes	+	—
2,8	5,0	limes	—	+	—
2,1	5,0	—	—	+	—
1,7	5,0	—	—	limes	—
1 3	5,0	—	—	—	—
D. Z.	—	13,9	10,9	23,8	(0)
Stickstoff-Substanz %	—	0,31	0,32	0,59	0,48
Nichtzucker %	—	5,99	2,48	8,14	4,75

d) Californische Honige.

Die Proben 16 und 17, deren Geschmack bereits als fade, bonbonartig zu bezeichnen war, zeigten keine diastatische Wirksamkeit. Beide hatten einen auffallend geringen Eiweißgehalt (0,17 und 0,18%). Da die Gewinnungsweise naturgemäß nicht bekannt ist, so muß es dahingestellt bleiben, ob das negative Ergebnis als eine Folge zu hohen Erhitzens zu betrachten ist. Probe 18, die direkt aus Californien in Waben importiert wurde, weist bei 6,86% Nichtzucker und 0,42% Stickstoffsubstanz eine Diastasezahl von 17,9 auf. Probe 19 (Diastasezahl 23,8) war von gutem Aroma und Geschmack.

Fermentlösung ccm	Honig No. 16	Honig No. 17	Honig No. 18	Honig No. 19
10,0	—	—	+	+
10,0	—	—	+	+
10,0	—	—	+	+
7,7	—	—	+	+
6,0	—	—	+	+
4,6	—	—	+	+
3,6	—	—	+	+
2,8	—	—	+	+
2,1	—	—	limes	+
1,7	—	—	—	limes
1,3	—	—	—	—
D. Z.	0	0	17,9	23,8
Stickstoff-Substanz %	0,17	0,18	0,42	0,32
Nichtzucker %	4,26	3,32	6,86	6,14

e) Die Honige der Länder Mexiko, Haiti, Guatemala und Chile.

Alle Honige dieser Länder wiesen mittlere Diastasezahlen auf.

Besonders ist noch zu bemerken, daß der Haitihonig 27 bei einem Nichtzuckergehalt von 2,86 % und einem Eiweißgehalt von 0,18 % die Diastasezahl von 8,3 ergab.

Fermentlösung ccm	Mexiko-Honig					Haiti-Honig			Guatemala-Honig		Chile-Honig
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
7,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,6	+	+	+	+	+	+	+	limes	+	+	+
3,6	+	+	limes	+	limes	limes	limes	—	+	+	+
2,8	limes	+	—	+	--	—	—	—	limes	+	limes
2,1	—	limes	—	limes		—	—		—	limes	
D Z.	13,9	17,9	10,9	17,9	10,9	10,9	10,9	8,3	13,9	17,9	13,9
Stickstoff-Substanz %	0,43	0,43	0,41	0,47	0,47	0,25	0,31	0,18	0,30	0,28	0,38
Nichtzucker %	6,67	7,25	4,41	6,77	6,94	2,04	5,99	2,86	5,80	6,01	3,71

2. Deutsche Honige.

Einwandfreies inländisches Material lieferten mir in erster Linie Heidehonige in Waben, welche sich nach der chemischen Analyse und der äußeren Beschaffenheit als Qualitätshonige erwiesen. Sie zeichnen sich sämtlich wie die Domingohonige durch hohe Diastasezahlen aus. Von diesen unterscheiden sie sich, von Aroma und Geschmack abgesehen, durch den bedeutend höheren, charakteristischen Eiweißgehalt. Von den chemischen Daten erscheint die sehr starke Linksdrehung bei Probe 38 bemerkenswert. Der Versuchshonig 36, der als Leckhonig in einer Honighandlung gekauft war, hatte bei verhältnismäßig hohem Wassergehalt die geringste Diastasezahl (17,9). Die beiden Sommer- (Misch-) Honige wiesen einen auffallend geringen Säuregehalt auf (siehe Tabelle).

Fermentlösung ccm	Heidehonige								Mischhonige	
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
4,6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,8	+	+	+	+	+	+	+	+	limes	+
2,1	+	+	+	+	+	limes	+	+	—	limes
1,7	+	+	limes	limes	+	—	+	+	—	—
1,3	+	+	—	—	limes	—	+	+	—	—
1,0	limes	limes	—	—	—	—	limes	limes	—	—
D. Z.	38,5	38,5	23,8	23,8	29,4	17,9	38,5	38,5	13,9	17,9

3. Fütterungshonige und Kunstprodukte.

Probe 41. Dieselbe kann nicht als Typus eines Fütterungshonigs gelten, da sie mit Resten von Naturhonig, der in der Wabe zurückgeblieben war, vermischt war. Er war sehr verunreinigt, stark gärend.

Probe 42 war ein reines, nicht ganz reifes Fütterungsprodukt (die Wabe war unvollkommen bedeckelt). Im Analysenbild beider erscheint der Kochsalzbefund auffällig. Ich erfuhr, daß es vielfach in Imkerkreisen Brauch sei, der zur Fütterung bestimmten Rohrzuckerlösung Kochsalz hinzuzufügen, wodurch sich ein besseres Gedeihen der Bienen sichtlich bemerkbar machen soll, eine Erklärung die angesichts der physiologischen Wirkung dieses Salzes wohl einleuchtet. Ob nun aus einem höheren Gehalt an Kochsalz, dessen Vorhandensein im Honig bis jetzt nicht befriedigend aufgeklärt ist[1]), auf einen Zuckerfütterungshonig geschlossen werden darf, muß zunächst dahingestellt bleiben. Allerdings kann wohl gesagt werden, daß z. B. Algaroba-Blütenhonige, für die ein erheblicher Kochsalzgehalt geradezu typisch ist, auch nach der chemischen Analyse[1]) zum Teil recht auffallende Befunde zeigen. Ferner möchte ich darauf hinweisen, daß die Zahl 8,3 als untere Grenze für die Diastasemenge im Naturhonig nicht zu hoch angenommen scheint, da selbst im Fütterungsprodukt, welches lediglich animalische aber nicht pflanzliche Diastase im Gegensatz zu echten Honigen enthält, dieser Wert erreicht wurde. Die beiden Befunde zeigen außerdem, daß Zuckerfütterungshonige nur unter Zuhilfenahme analytisch-chemischer Bestimmungen (Rohrzucker, Stickstoffsubstanz und anderer), besonders aber nach Thöny[2]) durch das Präcipitinverfahren erkannt werden können. Der Nachweis von Kochsalz könnte nach obigen Darlegungen ev. zu ihrer Indentifizierung beitragen. Hinsichtlich des Diastasegehaltes fielen mir in der Tabelle die beiden Fütterungsprodukte auf, die Thöny nach Auzinger's Angabe prüfte. Die eine Probe (70) war amylolytisch völlig unwirksam (Farbton nach Hinzufügung der Jodlösung schwarzblau); die andere (71) enthielt nur Spuren Diastase (Farbton dunkelviolett). Wenn weitere Untersuchungen diese Befunde bestätigen, — was sehr wünschenswert, aber nicht wahrscheinlich ist — insofern, als Zuckerfütterungshonige nur unbedeutende diastatische Wirkungen aus-

Fermentlösung ccm	Zuckerfütterungshonige		Kunsterzeugnisse			
	41	42	43	44	45	46
10,0	+	+	—	—	—	—
10,0	+	+	—	—	—	—
10,0	+	+	—	—	—	—
7,7	+	+	—	—	—	—
6,0	+	+	—	—	—	—
4,6	limes	+	—	—	—	—
3,6	—	limes	—	—	—	—
D. Z.	8,3	10,9	0	0	0	0

[1]) Vgl. Lendrich und Nottbohm, diese Zeitschrift 1911, 22, 633.

[2]) Thöny, Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene. 3. Heft 2.

zulösen vermögen, so wären auch diese Fälschungen durch die Biene allein auf Grund des niedrigen Diastasegehaltes festzustellen. Da Fütterungshonige das für Honig Spezifische, die Fermente, nur teilweise (animalischer Herkunft) besitzen, so ist ihnen vom biologischen Standpunkt aus der Name Honig nicht ganz abzusprechen („Zuckerfütterungshonig" oder „Zuckerhonig". Vgl. Lührig, Jahresbericht des Chemischen Untersuchungsamtes der Stadt Breslau 1910).

4. 29 Honige unbekannter Herkunft.

Sehen wir von den erhitzten Auslandshonigen und dem Hawaihonig 6 (D. Z. : 6,5) mit einem recht auffallenden chemischen Befund (Stickstoffsubstanz 0,16 %, Nichtzucker 0,52 %) ab, so könnten wir die Diastasezahl 8,3 als unterste Grenze des Diastasegehaltes echter Honige, allerdings mit Vorbehalt, annehmen. Wahrscheinlich sind die Anforderungen betreffs des Fermentgehaltes echter Honige höher zu stellen (vgl. voriges Kapitel IV, 3).

Nachdem so eine gewisse Unterlage (die durch Untersuchung durchaus einwandfreien inländischen Materials später erweitert werden soll,) für den Diastasegehalt echter Honige, der Zuckerfütterungsprodukte und Kunsthonige geschaffen war, wurden die im Handel befindlichen, bei der amtlichen Kontrolle eingelieferten Honige auf ihren Fermentgehalt geprüft.

Dabei ergab sich, daß von 29 untersuchten Proben 12 (also 41 %) eine niedrigere Diastasezahl als 8,3 (vorläufige Grenzzahl für Naturhonige) aufwiesen.

Die Proben No. 47—50 sind zweifellos erhitzt (Bonbongeschmack).
„ „ „ 51—53 sind mit größter Wahrscheinlichkeit mit Rohrzucker,
„ „ „ 54—56 mit Invertzucker gefälscht.
„ „ „ 57—58 sind Hawaihonige, geschmacklich wie durch den hohen Kochsalzgehalt erkennbar.

Von den übrigen ist Probe 59 hervorzuheben, in welchem Honig allem Anschein nach ein Fütterungsprodukt vorlag (Rohrzucker 7,79 %, Kochsalz 0,02 %).

Die Probe 68 ist ein Honigtauhonig, charakterisiert durch die Rechtsdrehung, den hohen Nichtzuckergehalt und durch den Geschmack.

Fermentlösung ccm	Stärkelösung ccm	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
10	1	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+
10	2,5	—	—	limes	+	—	—	+	+	+	—	+	+
10	5,0	—	—	—	limes	—	—	limes	limes	limes	—	+	+
7,7	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	limes	+
6,0	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	limes
4,6	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D. Z.	—	0	0	1	2,5	0	0	2,5	2,5	2,5	0	5,0	6,5

Fermentlösung ccm	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
4,6	+	limes	limes	limes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,6	+	—	—	—	limes	limes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,8	limes	—	—	—	—	—	limes	limes	limes	+	+	+	+	+	+	+	+
2,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	limes	limes	limes	limes	limes	+	+	+
1,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	limes	+	+
1,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	limes	+
1,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	limes
D. Z.	13,9	8,3	8,3	8,3	10,9	10,9	13,9	13,9	13,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	23,8	29,4	38,5

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Untersuchung von Natur- und der im Handel befindlichen Honigen angeführt:

No.	Bezeichnung	Wasser %	Säure, ccm N.-Alkali für 100 g Honig	Polarisation der Lösung 10 g : 100 ccm im 2 dm-Rohr vor der Inversion	Polarisation der Lösung 10 g : 100 ccm im 2 dm-Rohr nach der Inversion	Reaktion nach Fiehe	Reaktion nach Lund (Phosphorwolframsäure)	Stickstoffsubstanz %	Diastasezahl	Bemerkungen
31	Heidehonig in Waben . . .	18,73	2,2	— 2,88	— 3,30	negativ	—	0,95	38,5	—
32	Heidehonig in Waben . . .	17,50	2,6	— 3,30	— 3,50	„	—	1,21	38,5	—
33	Heidehonig . .	21,85	3,9	— 3,68	— 4,00	„	—	1,29	23,8	—
34	Heide- u. Buchweizenhonig .	19,18	3,2	— 2,50	— 2,76	„	—	1,04	23,8	—
35	Heidehonig in Waben . . .	19,99	2,8	— 3,40	— 3,90	„	—	0,76	29,4	—
36	Leckhonig (Spätherbst, besond. Heidehonig) .	24,70	4,2	— 3,55	— 3,80	„	—	0,67	17,9	stark gärend
37	Heidehonig in Waben . . .	20,77	3,2	— 3,50	— 3,74	„	—	0,81	38,5	—
38	Heidehonig in Waben . . .	19,42	2,9	— 5,30	— 5,50	„	—	0,95	38,5	—
39	Sommer-(Mischhonig 1911 .	17,26	0,5	— 1,70	— 2,00	negativ	—	0,23	13,9	—
40	Sommer-(Misch-)honig 1912 .	17,20	0,8	— 1,35	— 1,80	„	—	0,25	17,9	—
41	Fütterungshonig aus unreinen Waben . . .	25,42	3,6	— 2,10	— 2,40	negativ	—	0,25	8,3	Chlornatrium: 0,05 % stark gärend
42	Fütterungshonig, rein .	24,13	1,0	— 1,10	— 2,40	„	—	0,21	10,9	Chlornatrium: 0,22 %
47	—	18,40	1,6	— 2,60	— 2,96	negativ	0,8	—	0	Überhitzte Honige
48	—	18,46	1,5	— 2,40	— 3,00	„	0,9	—	0	
49	—	20,14	1,3	— 2,00	— 2,52	„	0,5	—	1	
50	—	18,46	1,7	— 2,75	— 2,90	„	0,7	—	2,5	

No.	Bezeichnung	Wasser %	Säure, ccm N.-Alkali für 100 g Honig	Polarisation der Lösung 10 g : 100 ccm im 2 dm-Rohr vor der Inversion	Polarisation der Lösung 10 g : 100 ccm im 2 dm-Rohr nach der Inversion	Reaktion nach Fiehe	Reaktion nach Lund (Phosphorwolframsäure)	Stickstoffsubstanz %	Diastasezahl	Bemerkungen
51	—	18,85	0,75	— 1,30	— 2,62	negativ	0,4	—	0	Saccharose (gew.-analyt.) 5,97 %
52	—	19,24	1,5	+ 1,14	— 3,40	„	0,4	—	0	23,85 %
53	—	18,67	0,5	— 1,42	— 2,76	„	0,4	—	2,5	7,07 %
54	—	18,01	2,0	— 2,05	— 2,60	kirschrot, später verblassend	0,65	—	2,5	Verdächtige bzw. beanstandete Honige
55	—	22,12	1,8	— 2,18	— 2,66	kirschrot +	2,4	—	2,5	verfälschter Heidehonig
56	—	20,59	1,9	— 2,10	— 3,00	kirschrot +	0,15	—	0	
57	—	18,46	1,1	— 2,58	— 3,14	negativ	0,7	—	5,0	Chlornatrium 0,41 %
58	—	17,50	0,9	— 2,70	— 3,20	„	0,65	—	6,5	„ vorhanden. Mit $AgNO_3$ starke Fällung
59	—	18,85	1,5	— 0,35	— 2,10	negativ	0,95	—	13,9	Anscheinend Zukkerfütterungshonig, Saccharose 7,79 %, Chlornatrium 0,02 %
60	—	20,08	3,2	— 2,20	— 2,66	negativ	0,85	—	8,3	—
61	—	18,67	1,3	— 2,45	— 2,88	„	0,65	—	8,3	—
62	—	21,34	4,6	— 2,26	— 2,44	„	1,9	—	8,3	—
63	—	18,10	2,1	— 2,50	— 2,98	„	0,8	—	10,9	—
64	—	19,42	2,5	— 1,90	— 2,40	„	0,9	—	10,9	—
65	—	22,39	2,6	— 1,80	— 2,40	„	1,75	—	13,9	—
66	—	19,99	2,5	— 0,98	— 1,28	„	1,45	—	13,9	—
67	—	16,42	1,2	— 1,95	— 2,10	„	0,6	—	13,9	—
68	—	15,22	1,9	+ 3,75	+ 1,50	„	0,9	—	17,9	Honigtauhonig
69	—	21,10	3,6	— 1,85	— 2,80	„	5,6	—	17,9	—
70	—	20,77	2,7	— 2,10	— 3,00	„	3,45	—	17,9	—
71	—	22,96	2,9	— 2,00	— 2,20	„	2,05	—	17,9	—
72	—	18,34	3,1	— 2,70	— 2,90	„	1,2	—	17,9	—
73	—	19,36	1,9	— 2,25	— 2,68	„	2,4	—	23,8	—
74	—	21,34	4,0	— 3,08	— 3,28	„	5,3	—	29,4	—
75	—	20,14	3,0	— 3,50	— 3,70	„	8,5	—	38,5	—

V. Zusammenfassung.

1. Beurteilung der Honige auf Grund des Diastasegehaltes.

Die meisten Fachgenossen werden gleich mir unter dem Eindruck stehen, daß sehr viele „Honige“ diese Bezeichnung nicht verdienen. Trotzdem scheut sich der Nahrungsmittelchemiker oft und mit Recht, verdächtige Honige zu beanstanden, weil in vielen Fällen der Gegensachverständige den Nachweis erbringen kann, daß Untersuchungen an authentisch echtem Material ähnliche Analysenergebnisse zeitigten.

Treffend bemerkt Witte[1]) bezüglich der zurzeit üblichen Untersuchung und Beurteilung der Honige, daß wir „trotz aller Fortschritte noch auf der ersten Stufe der Erkenntnis stehen".

Von den bisherigen chemisch-analytischen Kriterien unterscheidet sich das neue, der Gehalt an Diastase, dadurch, daß letztere nicht von äußeren Verhältnissen, den Pflanzenarten, dem Flugort oder kurz der Nahrung der Biene abhängig ist, sondern daß sie größtenteils ein arteigenes Sekret des Bienenkörpers selbst darstellt und naturgemäß jedem Honig beigemischt sein muß.

Damit komme ich auf den schon im Jahre 1902 von Professor Langer[2]) auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte vertretenen Standpunkt zurück, daß als Charakteristikum für „Honig" der Gehalt an Fermenten anzusehen ist.

Wir sind also in der Lage, durch Bestimmung der Diastasemenge innerhalb kurzer Zeit festzustellen, ob ein Naturhonig vorliegt oder nicht.

Welche Bedeutung dem neuen Kriterium, der Diastasezahl, beizumessen ist, beweist die Tatsache, daß 41% (nämlich 12 von 29) der untersuchten, im Handel befindlichen Proben nicht den Anforderungen genügten, welche an Honig in biologischer Hinsicht zu stellen sind.

Aus diesen Darlegungen ergeben sich folgende neue Gesichtspunkte für die Beurteilung der Honige.

1. Die Honigdiastase ist sowohl tierischer wie pflanzlicher Herkunft.

2. Die quantitative Bestimmung der Diastase ermöglicht die Bildung eines allgemeinen Urteils über den biologischen beziehungsweise ernährungsphysiologischen Wert des Honigs.

3. Eine hohe Diastasezahl schließt den Verdacht einer Fälschung ohne weiteres aus (Beispiel 74, 75). Hohe Diastasezahlen lieferten Domingo-, Hawaihonigtau- und deutsche Heide-Honige; vom ernährungsphysiologischen Standpunkt aus sind sie am höchsten zu bewerten.

4. Eine mittlere Diastasezahl kann in Verbindung mit der Fiehe'schen Reaktion, der Präcipitinreaktion und anderen Analysenergebnissen einen Fälschungsverdacht bestätigen.

5. Eine niedrige Diastasezahl unter der für echte Honige festgestellten Grenze kennzeichnet ein minderwertiges Produkt, welches entweder verfälscht oder überhitzt ist.

6. Einer fermentfreien Ware (D. Z.: 0) kommt die Benennung „Honig" nicht zu, eine solche sollte nicht unter dieser Bezeichnung im Handel geduldet werden.

Dem Einwand, ein unzulänglicher Gehalt an Diastase sei die Folge zu hohen Erhitzens, ist entgegenzuhalten, daß schon verhältnismäßig hohe Temperaturen (über 60°) angewendet werden müssen, um eine Schädigung der Fermente zu bewirken, und daß ein überhitzter Honig eben keine Handelsware ist (Muttelet), sondern ein denaturiertes Produkt (Langer), weil er Einbuße an Aroma und den biologischen Eigenschaften erfahren hat. Bei dieser Gelegenheit möchte ich darauf hinweisen, daß ein so hohes Erhitzen durchaus zu verwerfen ist, da selbst die zähesten Heidehonige nach Vorwärmen im gut geheizten Zimmer bei Anwendung sog. Honiglös- und Entdeckelungsmaschinen geschleudert werden können, wovon ich mich selbst durch Augenschein überzeugte. Meines Erachtens machen sich die Fälscher in vielen Fällen die

[1]) Diese Zeitschrift 1911, **21**, 305.
[2]) Diese Zeitschrift 1902, **5**, 1204.

Eigenschaft des Honigs zunutze, Rohrzucker bei erhöhter Temperatur schnell zu invertieren. Daß aber bei der Erwärmung des Honigs der Optimalpunkt überschritten wird, wodurch die Fermente geschädigt bezw. zerstört werden, wird dabei aus Unkenntnis übersehen.

Betreffs erhitzten Honigs schließe ich mich, wie wohl die meisten Kollegen, der Ansicht Auzinger's an, „daß vom raffiniert gefälschten Honig zum länger erhitzten kein allzuweiter Sprung ist, während zwischen diesen beiden und dem echten unerhitzten Honig eine unüberbrückbare Kluft liegt, nämlich der Unterschied in den biologischen Eigenschaften!"

Wenn dieser Standpunkt, besonders hinsichtlich der Punkte 5 und 6, die Zustimmung der Fachgenossen findet und der sachlichen Kritik standhält und die hieraus sich ergebenden Folgerungen beachtet werden, so steht zu hoffen, daß gerade die minderwertigen Erzeugnisse, welche unter der Flagge „Honig" segeln, aus dem Handel verschwinden.

2. Bestimmung und Beeinflussung der Diastase.

1. Betreffs der Versuchsanstellung (s. früher) ist hervorzuheben, daß die quantitative Bestimmung der Honigdiastase stets bei gleichem Volumen (16 ccm) auszuführen ist, weil

a) dies allgemeiner Grundsatz bei Ausführung biochemischer Reaktionen ist;
b) der Farbton stets bei demselben Rauminhalt festzustellen ist;
c) die ermittelten und unten beschriebenen günstigsten Verhältnisse (Temperatur, Säure, Kochsalz) sich auf das genannte Volumen beziehen.

Die Stärkelösung ist, wie Versuche zeigen, nur 2 Tage zu benutzen.

Der Jodzusatz muß zur Erzielung vergleichbarer Ergebnisse kurze Zeit nach der Digestion erfolgen. Die einwandfreie, quantitative Bestimmung der Honigdiastase setzt die Kenntnis der Eigenschaften dieses Fermentes voraus. An Beispielen wurde nachgewiesen, daß direkt unrichtige Werte gefunden wurden bei Nichtberücksichtigung der spezifischen Wirkungsweise.

2. Einfluß von Kochsalz. Während ein Zusatz von 0,5 ccm $^1/_{1000}$ N.-Chlornatriumlösung keinen Einfluß auf die diastatische Wirksamkeit ausübte, war ein solcher in der Konzentration $^1/_{100}$ N. unverkennbar. Bei Anwendung von $^1/_{10}$ N.- und $^1/_5$ N.-lösung erreichte die aktivierende Kraft ihr Optimum, bei Zusatz von $^1/_1$-N.-lösung war schon ein geringer Rückgang zu bemerken; bei Zusatz größerer Mengen dieses Neutralsalzes wurde die Wirkung gehemmt und schließlich aufgehoben.

3. Einfluß von Säuren.

a) Die neutralisierte Honigfermentlösung wurde durch 0,5 ccm $^1/_{1000}$ N.-Lösung der geprüften anorganischen wie organischen Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure, Ameisensäure, Oxalsäure und Essigsäure) gar nicht oder wenig, dagegen durch 0,5 ccm $^1/_{100}$ N.-Lösung stets deutlich, am besten durch Essigsäure und Salzsäure, im günstigen Sinne beeinflußt. Essigsäure zeigt insofern ein besonderes Verhalten, als sie auch in der Konzentration $^1/_{10}$ N. die amylolytische Wirkung hemmt aber nicht aufhebt, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Säuren.
b) Alkalien (Barytwasser, Natriumhydroxyd und Natriumcarbonat) hemmen in der Konzentration $^1/_{1000}$ N. nicht oder wenig; durch Zusatz von 0,5 ccm $^1/_{100}$ N.-Alkali ist die Fermentwirkung in allen Fällen stark herabgesetzt, durch $^1/_{10}$ N.-Alkali aufgehoben.

Natriumcarbonat schädigt die Honigdiastase am wenigsten, hiernach Natronlauge und schließlich Bariumhydroxyd.

Die Unterscheidung der Honigdiastase vom Ptyalin des Speichels beruht auf der großen Empfindlichkeit letzteren Fermentes Säuren gegenüber. Durch 0,5 ccm $^1/_{50}$ N.-Essigsäure wird die optimale Wirkung der Honigdiastase, aber eine starke Hemmung des Ptyalins herbeigeführt.

3. Einfluß der Alkoholfällung. Schon bei kurzer Dauer der Alkoholfällung trat eine erhebliche Schädigung der Honigdiastase ein; nach 24-stündiger Einwirkung des Alkohols war die amylolytische Wirkung auf ein Minimum reduziert.

4. Einfluß des Filtrierens. Es gelingt in vielen Fällen, durch Filtration die amylolytische Kraft der Honigfermentlösung herabzumindern und sogar aufzuheben.

5. Einfluß der Dialyse. Nach 2-tägiger Dialyse war die Fermentlösung ihrer amylolytischen Kraft völlig beraubt; durch Zusatz von Kochsalz wurde eine, wenn auch schwache, Aktivierung erzielt.

6. Einfluß der Schüttelbewegung. Nach 6-stündigem Schütteln war eine teilweise Hemmung der Honigamylase nachzuweisen. Bei Zugabe von Toluol als Antisepticum war schon nach halbstündigem Schütteln völlige Inaktivierung eingetreten.

7. Einfluß des Erhitzens.

a) Bei einstündigem Erhitzen des unverdünnten Honigs bis 60° war keine Abnahme der diastatischen Kraft zu bemerken, erst bei 65° trat eine geringe Schwächung ein, die dem Temperaturanstieg entsprechend größer wurde. Bei 85—90° war die Honigamylase zerstört.

b) Honiglösungen sind gegen Wärme weniger widerstandsfähig. Nach einstündiger Digestion bei 0° ist keine amylolytische Wirkung wahrzunehmen. Von 15° ab steigt die Wirksamkeit allmählich an und erreicht bei 45 bis 50° ihr Optimum. Bei 55° tritt eine deutliche, bei 60° eine ganz erhebliche Hemmung ein. Bei 70° wird die Honigdiastase zerstört.

Von Interesse und praktischer Bedeutung ist auch das verschiedene Verhalten der Honigamylase in unverdünntem Honig und in der Honiglösung bei Temperaturgraden unter dem Optimalpunkt (38—40°). Während das Ferment im unverdünnten Honig durch langandauerndes Erhitzen (48 Stunden) keine Beeinträchtigung erfuhr, trat nach 6-stündigem Erwärmen der Honiglösung eine vollkommene Inaktivierung ein.

Lebenslauf.

Geboren wurde ich, Friedrich Karl August Gothe zu Gandersheim (Braunschweig) am 13. Februar 1883, besuchte das Realprogymnasium meiner Vaterstadt und das Realgymnasium zu Goslar. Dem Studium der Chemie und Naturwissenschaften widmete ich mich auf den technischen Hochschulen Braunschweig, Hannover und den Universitäten Leipzig, Rostock. In der Praxis war ich längere Zeit als Chemiker tätig.

Ich bestand folgende Examina:

Abiturientenexamen, Verbandsexamen, die Staatsvor- und die Hauptprüfung für Nahrungsmittelchemiker.

Ich bin evangelisch-lutherischer Konfession.